

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Identificação de populações de *Biomphalaria*
(Gastropoda:Planorbidae) na região sul do Rio Grande
do Sul, Brasil.**

Michele Soares Pepe

Pelotas, 2006

Michele Soares Pepe

**Identificação de populações de *Biomphalaria*
(Gastropoda:Planorbidae) na região sul do Rio Grande
do Sul, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Dra. Maria Elisabeth Aires Berne
Co-orientador: Omar dos Santos Carvalho

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P421i Pepe, Michele Soares
 Identificação de populações de *Biomphalaria* (Gastropoda:
 Planorbidae) na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil /
 Michele Soares Pepe ; orientador Maria Elisabeth Aires
 Berne. – Pelotas, 2006. – 80f. : il. – Dissertação (Mestrado).
 Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
 Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Instituto de
 Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

 1.Parasitologia. 2.Esquistossomose. 3.Biomphalaria.
 4.Métodos morfológicos. 5.Métodos moleculares.
 6.Suscetibilidade. I.Berne, Maria Elisabeth Aires. II.Título.

CDD:

595.183

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne (Presidente)

Profa. Dra. Gertrud Muller Antunes

Profa. Dra. Inga Ludmila Veitenheimer Mendes

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Agradecimentos

A Deus, que trilhou ao meu lado toda essa trajetória e de toda minha vida, foi Apoio nas horas difíceis, foi Base nos momentos em que desanimei, foi Luz quando tudo parecia impossível, foi Pai quando senti abandono, foi Amigo quando precisei chorar, foi Irmão quando me senti órfã, foi Alegria quando tudo deu certo, foi Deus quando eu sabia que mais nada dependia de mim e principalmente foi Amor, nos momentos felizes e tristes, pois eu não tenho mais medo, pois sei que estás comigo sempre.

Aos meus pais, Gerson e Maria Inês, que viveram comigo cada etapa da minha vida, me incentivando, educando, vibrando comigo a cada passo certo e sofrendo comigo quando tudo parecia tão difícil. Pela presença, mesmo quando eu estava longe e, principalmente, pelo exemplo de cristãos e pessoas de bem que são para mim. Por todas as renúncias e alegrias, meu amor e gratidão eternos.

As minhas manas, Pri e Bibi, por todos os momentos que compartilhamos, felizes, alegres, de tempestade e de bonança e por tudo aquilo que não pude viver junto de vocês porque estava longe, me mostrando que todo carinho e amor familiar a distância jamais separa.

Ao meu amor, meu cúmplice, meu escolhido Vinicius, que conhece todas as Micheles, que sabe ser amoroso, forte, porto seguro, paciente, divertido, compreensivo, atencioso e foi a minha força quando me senti mais sozinha, meu ombro onde derramei todas as minhas lágrimas, minhas angústias e meus medos. Espero ter a vida toda para retribuir tudo que és para mim.

A minha querida orientadora Beth, que é muito mais que isso para mim, com licença da Natalia e do Rafael, é uma mãe zelosa, preocupada, que faz o impossível por aqueles que estão próximos, sendo para mim não só um exemplo de pesquisadora e profissional, mas de integridade e generosidade.

A professora Gertrud pelo incentivo e confiança no início de minha formação, compartilhando comigo seus ensinamentos e amizade.

Ao meu co-orientador Omar Carvalho, que me recebeu em seu laboratório, e me propiciou todas as condições necessárias para o bom desenvolvimento de grande parte da minha dissertação, além do carinho e atenção a mim destinada.

As estimadas pesquisadoras Roberta Caldeira e Liana Passos, que foram fundamentais na realização do meu experimento, ensinando-me, incentivando-me e acompanhando-me de perto, apontando caminhos e tirando as minha milhões de dúvidas com paciência e atenção.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela disponibilidade, troca de conhecimentos e vivências, amizade e respeito, permitindo fazer parte de suas vidas e experiências.

Aos meus inspecias amigos do mestrado Anelise, Cristiane, Denise, Hermann, Ricardo e Tiago, pelos momentos maravilhosos que compartilhamos juntos, fazendo parte um da vida dos outros, sendo parceiros e cúmplices, em especial aos meus amigos Anelise e Tiago, sempre tão presentes, afetuosos e disponíveis.

Aos queridos amigos do Laboratório de Parasitologia (UFPel): Ana Paula, Antonieta, Cristina, Daniela, D. Vera, Elizandra, Fabiane, Fernanda, Felipe, Hugo, Jerônimo, Joziani, Michele Peres, Neila, Nilton, Rafael, Rita e Tânia, pela amizade, carinho, disponibilidade no decorrer deste trabalho e principalmente no auxilio inestimável as saídas de campo e a manutenção dos moluscos em laboratório.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Helmintoses Intestinais e Moluscário (CpqRR): Antônio, Cíntia, Cristiane Lafetá, Cristiano, Davidson, Delza, Dílcia, Larissa, Paula, Pollanah, Ricardo, Ronaldo, Sandra Carvalho, Sandra Ribeiro, Simone Silva, Simone, Sthefane, Sueleny, Tatiana e Zezinho, pela forma carinhosa como me acolheram no laboratório, sempre dispostos a me ajudar e incentivar, auxiliando-me no decorrer do trabalho, tornando-o prazeroso e importante para minha formação.

As minhas queridas amigas Érica e Marcela, que me receberam de braços abertos em suas vidas no momento em que me senti muito sozinha e longe de casa, compartilhando comigo momentos de alegria e tristeza, permitindo uma amizade nova, mas muito forte. Aos amigos de Belo Horizonte: Celina, Denise, Fernanda Barbosa, Fernanda Freire, Héinton, Gabriela, Juciane, Marcos e Mauren os quais tive o prazer de conhecer e conviver durante cinco meses.

A minha mãe-mineira Lucinéia, que foi a minha família quando eu estava longe de casa, cuidando de mim com muito carinho, me dando toda atenção e sendo sempre afetuosa e disponível.

Ao prof. José Nascimento pela revisão deste trabalho. Ao Luciano Pinto pelas valiosas sugestões feitas sobre esse trabalho. A minha amiga Ana Paula pela tradução do resumo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa que permitiu a realização dessa dissertação.

Quando citamos nomes, corremos o risco de esquecer alguém, e, por isso, gostaria de agradecer a todos que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante a realização deste trabalho, auxiliando e transmitindo seus conhecimentos.

"Pensar pede audácia,
pois refletir é transgredir a
ordem do superficial que
nos esmaga"

Lya Luft

Resumo

Pepe, Michele Soares. **Identificação de populações de *Biomphalaria* (Gastropoda:Planorbidae) na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A esquistossomose mansônica é uma doença condicionada a presença de moluscos, do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910), de hábitos aquáticos suscetíveis ao *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). O conhecimento sobre a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* é importante para o controle e vigilância epidemiológica da esquistossomose. A expansão dessa parasitose para a região sul do país foi evidenciada pela ocorrência de moluscos vetores, com destaque para *B. glabrata* (Say, 1818), bem como presença de portadores desse trematódeo, já que as condições ambientais são plenamente atendidas para desenvolvimento completo de seu ciclo biológico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as espécies de *Biomphalaria* na região sul do Rio Grande do Sul. Durante o ano de 2005 foram realizadas coletas de moluscos em 15 localidades de 12 municípios do Estado, sendo essas populações mantidas em condições de laboratório e analisadas as características dos habitats. A identificação morfológica dos moluscos foi realizada através de características das conchas e do tubo renal e anatomia dos órgãos reprodutivos. Complementar a isso foi realizada a identificação molecular através do PCR-RFLP com amplificação das regiões ITS, que incluem o gene da subunidade 5.8S do rDNA e os espaços transcritos ITS1 e ITS2. Foi testada a suscetibilidade de duas populações potencialmente vetoras de *S. mansoni* com a cepa LE. Foram identificadas sete populações de *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984), cinco de *B. peregrina* (Orbigny, 1835) e três de *B. oligoza* (Paraense, 1975) no diagnóstico morfológico e no molecular. Dentre todas as populações mantidas em laboratório, quatro populações de *B. tenagophila guaibensis* e todas as populações de *B. peregrina* reproduziram em laboratório, produzindo a geração F1. Duas populações de *B. peregrina* (Dom Pedrito e Rio Grande) infectadas experimentalmente apresentaram-se resistentes à infecção por *S. mansoni*. O diagnóstico específico por técnicas moleculares mostrou-se eficiente quando

comparado com o resultado morfológico, portanto uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos desses moluscos. É necessária a continuidade nas pesquisas malacológicas e epidemiológicas de diferentes populações de *Biomphalaria* spp. representativas de todo Estado, pois o conhecimento sobre as características destas populações permitirá traçar estratégias para evitar o estabelecimento e expansão da esquistossomose no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: esquistossomose, *Biomphalaria*, métodos morfológicos e moleculares, suscetibilidade.

Abstract

Pepe, Michele Soares. **Identification of *Biomphalaria* (Gastropoda Planorbidae) population in Southern of Rio Grande do Sul State, Brazil.** 2006. 80p. Dissertation (Master Degree in Parasitology) – Biology Institute, Federal University of Pelotas, Pelotas.

Mansonic schistosomiasis is a disease related to the presence of the snail, belonging to the genus *Biomphalaria* (Preston, 1910), which presents aquatic habit susceptible to the *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). The knowledge about the geographic distribution of the *Biomphalaria* species is important to the control and epidemiological monitoring of the schistosomiasis. The expansion of this parasitosis to the Southern region of Brazil was evidenced by the occurrence of the vector snail, especially *B. glabrata* (Say, 1818), the presence of the host of this trematod, as well as the environmental conditions which provide the settings to the development of the complete biological cycle. The aim of this work was characterize *Biomphalaria* species in the Southern of Rio Grande do Sul state, Brazil. The snails were collected during the year 2005, from 15 places of 12 municipalities of the state, these populations were maintained in laboratory conditions and the habitat characteristics analyzed. The morphological identification of the snails was realized trough the shelves characteristics, renal rid and reproductive organs anatomy. To complement this analyzes a molecular identification was carried out trough the PCR-RFLP with amplification of the ITS regions, which includes the gene of subunit 5.8S of the rDNA and the transcriptions spaces ITS1 and ITS2. The susceptibility of two populations potentially vectors were tested using the LE strain. Seven populations of *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984), five of *B. peregrine* (Orbigny, 1835) and three of *B. oligoza* (Paraense, 1975) were identified in the morphological and molecular diagnosis. Amongst the populations maintained in laboratory, four populations of *B. tenagophila guaibensis* and all populations of *B. peregrina* reproduced in these conditions, producing the F1 generation. Two populations of *B. peregrina* (from Dom Pedrito and Rio Grande counties) were experimentally infected and showing resistance to the infection by *S. mansoni*. The specific diagnosis performed by molecular techniques presents more efficiency when compared to the morphological diagnosis, became an important tool in epidemiological studies of this snail. The continuing of the malacology

and epidemiological research in different populations of *Biomphalaria* spp., which represents all the state is necessary, the knowledge of the characteristics of these populations permit to trace strategies to avoid the establishment and expansion of the schistosomiasis in Rio Grande do Sul state.

Key words: Schistosomiasis, *Biomphalaria*, Morphological and molecular methods, Susceptibility.

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Biomphalaria</i> sem a concha, vista pelo lado esquerdo	21
Figura 2	Vista lateral dos órgãos de <i>Biomphalaria glabrata</i> com o manto e o saco bucal dissecados.	22
Figura 3	Municípios (●) onde foram realizadas as coletas de <i>Biomphalaria</i> spp. no sul do estado do Rio Grande do Sul	43
Figura 4	Geração de F1 de <i>Biomphalaria</i> spp. obtida em condições de laboratório	46
Figura 5	Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma sub-espécie brasileiras do gênero <i>Biomphalaria</i>	48
Figura 6	Exposição à luz incandescente para infecção dos moluscos <i>Biomphalaria peregrina</i> e <i>Biomphalaria glabrata</i> por miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa LE) dispostos individualmente em placas de cultivo celular	50
Figura 7	Exposição dos moluscos à luz artificial para eliminação de cercárias, para verificação da infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	51
Figura 8	Distribuição das espécies de <i>Biomphalaria</i> encontradas nos diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Brasil.	54
Figura 9	Perfil de PCR específico do produto amplificado da região ITS do DNAr de <i>Biomphalaria</i> em gel de poliacrilamida 6%, cortado com prata	56
Figura 10	Perfis de PCR-RFLP obtidos da digestão do produto amplificado da região ITS do DNAr utilizando a enzima <i>DdeI</i> das diferentes populações de <i>Biomphalaria</i> em gel de poliacrilamida 6% corado com a prata	57
Figura 11	Habitats de diversos municípios do Rio Grande do Sul onde foram encontrados moluscos <i>Biomphalaria</i> spp.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1	Município e as respectivas localidades onde foram coletadas as diferentes populações de <i>Biomphalaria</i> spp.	44
Tabela 2	Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na reação de PCR	47
Tabela 3	Infecção experimental de duas populações de <i>B. peregrina</i> e uma população de <i>Biomphalaria glabrata</i> (controle) para avaliação da suscetibilidade a cepa LE de <i>Schistosoma mansoni</i>	49
Tabela 4	Espécies de <i>Biomphalaria</i> amostradas em municípios do Rio Grande do Sul, identificadas em laboratório e a procedência	53
Tabela 5	Procedência, espécie e habitats onde foram encontradas as diferentes populações de <i>Biomphalaria</i> na região Sul do Rio Grande do Sul	60
Tabela 6	Resistência de duas populações de <i>Biomphalaria peregrina</i> , RS, e uma população de <i>Biomphalaria glabrata</i> (controle), MG, à infecção com a cepa LE de <i>Schistosoma mansoni</i>	61

Lista de abreviaturas

CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desorribonucleotídeo trifosfatado
EMBRAPA-CPPSul	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Pecuária do Sul
ETS	Espaçadores transcritos externos
FEPAGRO	- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
Forrageiras	– Centro de Pesquisas de Forrageiras
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ITS	Espaçadores transcritos internos
LS-PCR	Reação em cadeia da polimerase em baixa estringência
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
rDNA	Acido desoxirribonucléico ribossomal
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA	Acido ribonucléico
SANEP	Serviço Autônomo de Saneamento de Pelotas
SSR-PCR	Reação em cadeia da polimerase - Repetições de Sequências Simples
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1. Introdução	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Revisão de literatura	19
3.1 Gênero <i>Biomphalaria</i>	19
3.2 Esquistossomose mansônica	24
3.3 Levantamentos epidemiológicos	26
3.4 Suscetibilidade de populações	32
3.5 Métodos moleculares	35
4. Material e método	42
4.1 Obtenção de amostras	42
4.2 Caracterização de ambientes	42
4.3 Manutenção e criação de moluscos em laboratório	45
4.4 Obtenção da geração F1	45
4.5 Identificação morfológica dos moluscos	45
4.6 Identificação molecular dos moluscos.....	46
4.6.1 Extração de DNA	46
4.6.2 PCR-RFLP	47
4.7 Infecção experimental de <i>Biomphalaria</i> com <i>Schistosoma mansoni</i>	49
4.8 Avaliação da suscetibilidade de <i>Biomphalaria peregrina</i> ao <i>Schistosoma mansoni</i>	50
5. Resultados	52
5.1 Identificação morfológica	52
5.2 Identificação molecular	55
5.3 Habitats onde foram encontrados os moluscos	58
5.4 Geração F1 obtida em laboratório	58
5.5 Avaliação da suscetibilidade de <i>Biomphalaria peregrina</i> ao <i>Schistosoma mansoni</i>	61
6. Discussão	62
7. Conclusões	69
Referências	70

1. Introdução

Moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) são hospedeiros intermediários do trematódeo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). Este parasito tem como hospedeiro definitivo o homem, causando a doença conhecida como esquistossomose. No mundo estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas estejam infectadas e 600 milhões vivem em áreas de risco. É endêmica em vários países das Américas e Ásia (OMS, 2005). No Brasil a área endêmica estende-se por 19 estados com 7 milhões de indivíduos infectados e 70 milhões expostos ao risco (Katz & Peixoto, 2000).

Dentre as espécies de *Biomphalaria* que ocorrem no Brasil são vetores dessa parasitose *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbygny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848). *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835) e *B. amazônica* (Paraense, 1966) foram infectadas experimentalmente em laboratório, sendo consideradas hospedeiras em potencial de *S. mansoni*.

A presença de diferentes espécies desse molusco pode ser vista como o principal fator para disseminação e manutenção da doença. Em áreas endêmicas grandes concentrações desses moluscos, aliadas a outros fatores de risco, favorecem a existência de localidades com altas prevalências da esquistossomose. Sua ampla distribuição confere a esquistossomose caráter expansivo até mesmo para áreas indenens.

A presença de *S. mansoni* no Estado está associada a descrição do primeiro foco de *B. glabrata*, tendo este sido encontrado em uma estação de piscicultura, localizada na cidade Esteio (Teixeira et al., 1999). Isso demonstra que a presença de moluscos vetores na região sul, associado à migração de

portadores de esquistossomose, são os fatores determinantes para a disseminação dessa helmintose.

A correta identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* é de suma importância para os estudos da esquistossomose. A alta variabilidade morfológica e genética, o tamanho reduzido de alguns espécimes e a similaridade interespecífica dificulta a identificação correta das espécies de *Biomphalaria*. Estudos moleculares são utilizados como ferramenta adicional a identificação morfológica. Protocolos já estabelecidos, principalmente associados à técnica de PCR e suas variações, permitem distinguir as diferentes espécies, através de perfis específicos e distintos (Caldeira et al., 1998; Vidigal et al., 2000b)

A esquistossomose, como na maioria das doenças tropicais, transcende a compreensão de sua causa biológica e requer o entendimento das causas sociais, econômicas, culturais e comportamentais envolvidas. Assim, o seu controle demanda medidas integradas, que incluem diagnóstico, tratamento, controle de vetores, saneamento, mas, sobretudo, envolvimento e participação da população no processo, o que pode ser alcançado através de programa de Educação em Saúde.

A manutenção de conhecimentos permanentemente atualizados sobre a distribuição geográfica das espécies dos moluscos transmissores de *Schistosoma mansoni* é fundamental para a preservação da eficiência dos programas de controle e vigilância epidemiológica da esquistossomose.

Devido à carência de informações atuais sobre a diversidade planorbídica do Sul do Rio Grande do Sul e a identificação recente de um foco de *S. mansoni* no estado, faz-se necessário a realização de um novo levantamento malacológico, visando conhecer e compreender as características das espécies de *Biomphalaria* desta região.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar as espécies de *Biomphalaria* presentes na região Sul do Rio Grande do Sul

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as diferentes populações do gênero *Biomphalaria* de 15 municípios da região Sul do Rio Grande do Sul;
- Comparar as técnicas de identificação morfológica e molecular em exemplares de diferentes populações;
- Obter a geração F1 de populações provenientes do campo.
- Verificar a suscetibilidade das espécies potencialmente transmissoras de *Schistosoma mansoni*.

3. Revisão de Literatura

3.1. Gênero *Biomphalaria*

Os moluscos constituem um filo distinto e particular, sem estreita semelhança ou afinidade filogenética com qualquer outro grupo. Os membros deste filo são bem sucedidos no processo evolutivo, permitindo uma grande variabilidade de formas, radiando-se numa diversidade morfológica tão ampla que permitiu adaptação a diferentes ecossistemas (Ruppert e Barnes, 1993).

Na parasitologia médica e veterinária tem importância os moluscos gastrópodes, sendo incluídos nas subclasses Prosobranchia e Pulmonata, com representantes de diversas ordens e famílias. Os moluscos pulmonados são normalmente de água doce ou terrestres, com concha espiralada, que pode ser reduzida, interna ou ausente, possuem saco pulmonar de abertura contrátil, são hermafroditas e ovíparos (Souza & Lima, 1997).

Os moluscos *Biomphalaria* pertencem ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora e Família Planorbidae. O nome do gênero tem origem do latim e refere-se a *Bis* (duas vezes) e *omphalos* (umbigo), devido ao aprofundamento do giro central em ambos os lados da concha (Paraense, 1975). A sinonímia no Brasil é *Planorbina* Haldeman, 1843, *Armigerus* Clessin, 1884, *Thaphius* H.A. & Adams, 1855, *Tropicorbis* Brow & Pilsbry, 1914, *Australorbis* Pilsbry, 1934 (Souza & Lima, 1997)

Biomphalaria spp. apresenta concha planispiral, diâmetro que varia de 7 a 40 mm e a largura cerca de 2 a 15 mm, giros delimitados por suturas que alargam-se gradativamente do centro até a abertura da concha (Paraense, 1972). Os lados da concha podem ser côncavos, planos ou levemente convexos, com giros que podem ser angulados, formando carena; a cor natural da concha (dependente do perióstraco) é amarelo-palha, sendo variável de acordo com as condições do ambiente em que vive, especificamente relacionada às substâncias corantes dissolvidas na água ou na lama dos criadouros (Paraense, 1975).

O corpo do molusco é quase todo revestido pela concha, que lhe serve de esqueleto e proteção. A massa visceral está envolvida pelo manto (Fig. 1), membrana fibrosa delgada, pigmentada pela melanina e cujo revestimento epitelial externo está em contato permanente com a superfície interna da concha, sendo a parede da cavidade onde se aloja a massa visceral (Paraense, 1972). A parte mole encontra-se presa a concha através do músculo columelar; na superfície ventral da cabeça localiza-se a boca, contornada pela mandíbula quitinosa em forma de T; a rádula, faixa quitinosa linguiforme e denteada, é retangular com dente central bicúspide e dentes laterais tricúspides (Paraense, 1975). No manto encontra-se a porção tubular do rim, chamado tubo renal, que se localiza entre as veias renal e pulmonar, tendo formato de “J” na sua extremidade distal (Paraense, 1975).

Na massa cefalopodal (lado esquerdo) encontram-se a abertura anal e proximamente as genitais masculina e feminina, pois são hermafroditas, apresentando ovoteste. Os órgãos femininos são glândula do albúmen, oviduto, glândula nidamental, útero, vagina e espermateca e pode apresentar bolsa da vagina; já o sistema masculino é formado de espermiduto, próstata, canal deferente e complexo peniano (prepúcio e bainha do pênis) (Fig. 2) (Paraense, 1972).

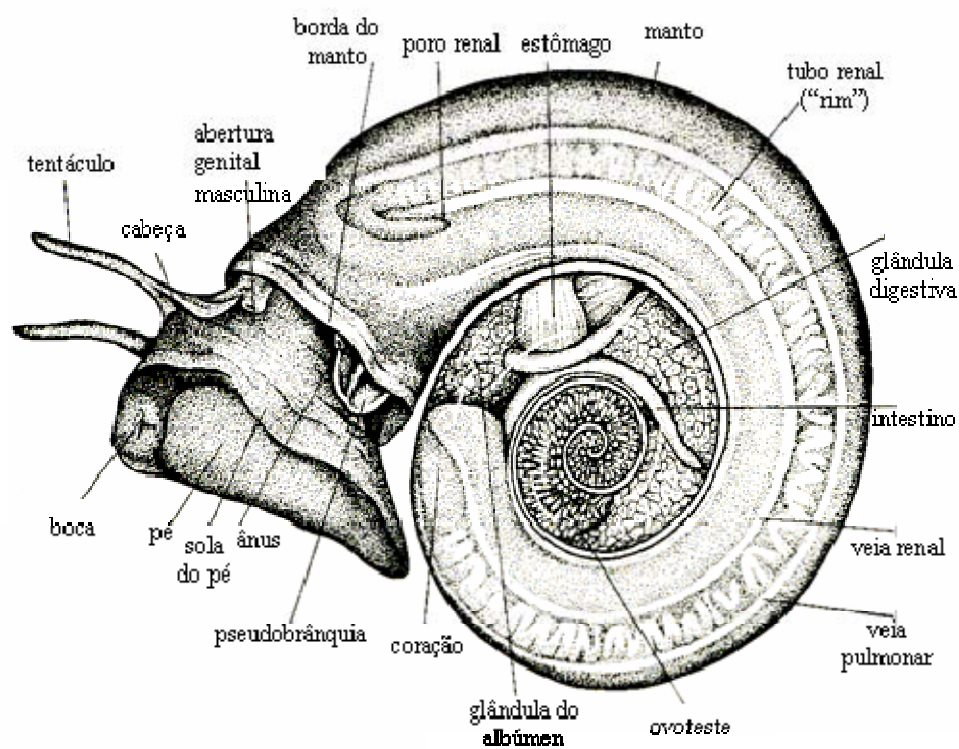


Figura 1- *Biomphalaria* sem a concha, vista pelo lado esquerdo.

Fonte: Paraense & Deslandes (1955).

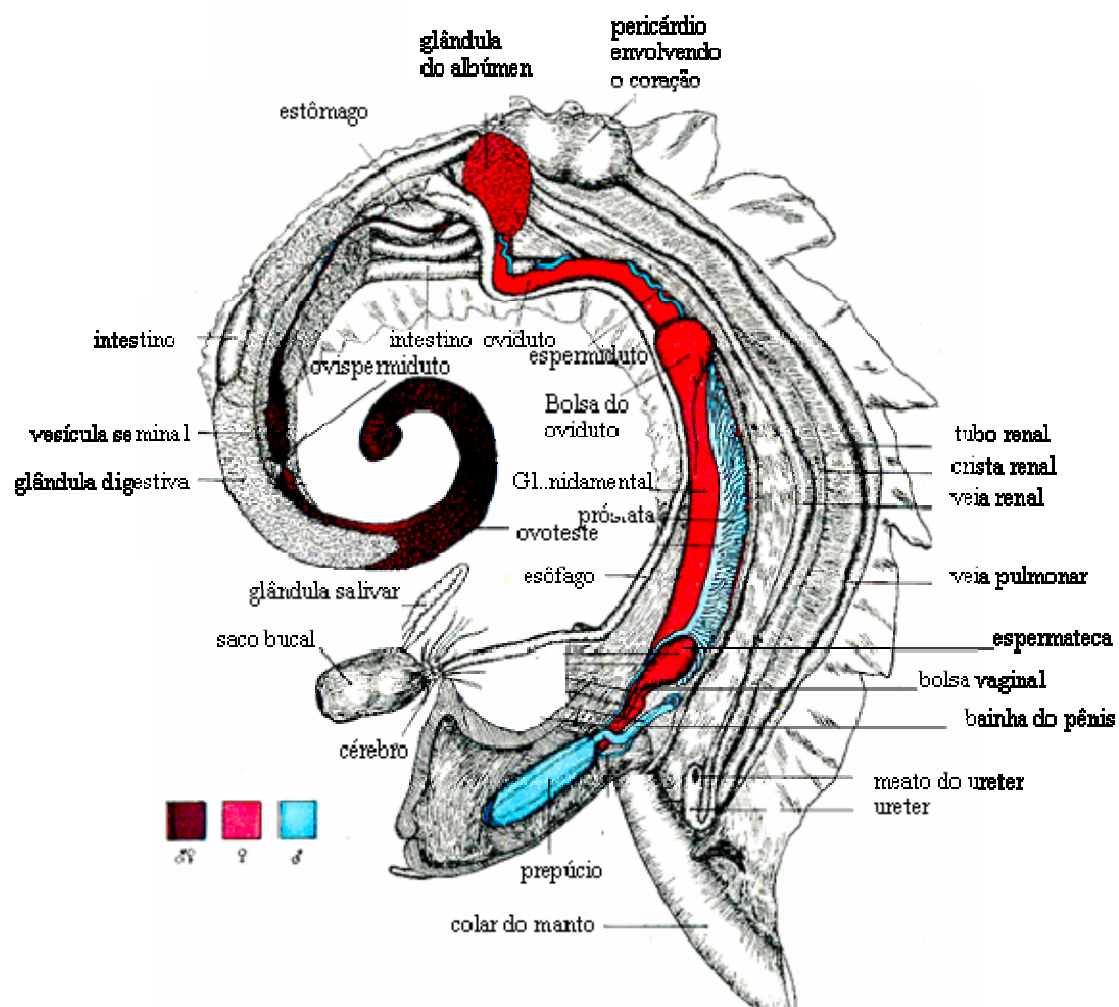


Figura 2 - Vista lateral dos órgãos de *Biomphalaria glabrata* com o manto e o saco bucal dissecados. Legenda e apresentação das figuras modificada a partir dos originais.

Fonte: Paraense & Deslandes (1955).

No ambiente, a sobrevivência dos planorbídeos é normalmente de um ano, sendo sua persistência no ambiente relacionada ao ritmo da reprodução, que depende de fatores ecológicos inerentes, que estão ligados a postura, fecundidade e viabilidade dos ovos (Caldeira, 1999).

Em relação à reprodução, os planorbídeos reproduzem-se preferencialmente por fecundação cruzada, mas também são capazes de se reproduzir por autofecundação; os ovos são postos individualmente e envolvidos por uma cápsula gelatinosa e transparente, garantindo sua aderência a um substrato, que pode ser folhas de plantas aquáticas, ou qualquer outra superfície sólida flutuante ou submersa (Souza & Lima, 1997).

No Brasil, são conhecidas as seguintes espécies: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1948), *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. kuhniana* (Clessin, 1883), *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *B. amazonica* (Paraense, 1966), *B. oligoza* (Paraense, 1975), *B. occidentalis* (Paraense, 1981) e *B.t. guaibensis* (Paraense, 1984). No Rio Grande do Sul são registradas *B. tenagophila* (Paranese, 1959), *B. straminea* (Cunha Neto, 1972), *B. oligoza* (Paraense, 1974), *B. peregrina* (Paraense, 1966), *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984), *B. glabrata* (Carvalho et al., 1998).

Biomphalaria peregrina apresenta concha com diâmetro variando entre 3,5 a 16,5mm, com cinco a seis giros arredondados, com concavidade de profundidade variável (Paraense, 1966). Em relação à morfologia interna a superfície ventral do tubo renal apresenta-se lisa e sem crista; bainha do pênis varia de um pouco mais curta a um pouco mais longa que o prepúcio e a porção média possui diâmetro muito maior que o da porção mais larga do canal deferente; parede do pênis com duas camadas musculares (interna longitudinal e externa oblíqua); parede vaginal expandida em bolsa, divertículos prostáticos anteriores recobrem a parte apical do corpo da espermateca (Paraense, 1966). Apesar de ser observado muita variação entre os indivíduos, considera-se essa espécie como polimórfica, sendo essas diferenças atribuídas à variação intraespecífica (Paraense, 1966). A elevada variabilidade morfológica e genética intraespecífica de *B. peregrina* pode ser atribuída a sua larga distribuição e dispersão na região neotropical (Spatz et al., 2000).

Biomphalaria oligoza possui concha com até 11mm de diâmetro, 3mm de largura e cinco giros arredondados, crescendo lentamente em diâmetro, periferia arredondada (Paraense, 1974). Na anatomia interna destaca-se a ocorrência de poucos divertículos prostáticos (0 a 7), porção média da bainha do pênis de diâmetro igual ou maior que a porção mais larga do canal deferente, vagina com bolsa discreta (Paraense, 1974).

Biomphalaria tenagophila guaibensis apresenta concha com até 18,5 mm de diâmetro, 7,5 mm de largura e 6 giros. Internamente apresenta parede vaginal expandida em bolsa, prepúcio mais largo e muito mais longo que a bainha do pênis, canal deferente delgado e muito longo (Paraense, 1984). Observa-se grande similaridade morfológica com *B. tenagophila tenagophila*, principalmente em relação a concha e órgãos do sistema genital, exceto a anatomia do complexo peniano, sendo essa característica essencial para diferenciação das subespécies (Paraense, 1984).

É possível observar uma grande semelhança de *B. tenagophila guaibensis* com *B. occidentalis*, mas se distingue facilmente pela presença de bolsa vaginal, que falta em *B. occidentalis*, além de apresentar diferenças na proporção entre bainha do pênis e prepúcio, sendo a diferença de comprimento bem menos evidente que em *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984).

No Brasil as espécies hospedeiras intermediárias naturais de *S. mansoni* são *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*; já *B. peregrina* e *B. amazonica*, são consideradas hospedeiras em potencial deste parasito, visto que algumas populações destas espécies foram infectadas experimentalmente em laboratório (Paraense & Corrêa 1973; Corrêa & Paraense 1971).

3.2. Esquistossomose mansônica

A esquistossomose é uma parasitose causada pelo trematódeo *Schistosoma* sp., que tem como principais agentes etiológicos, para o homem, as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* (Sambon, 1907) e *S. japonicum* (Katsurada, 1904), sendo endêmica em países da América do Sul, Caribe, África e da região oriental do Mediterrâneo (OMS, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a esquistossomose apresenta a segunda maior prevalência entre as doenças tropicais, em que estimada em 200 milhões de pessoas portadoras dessa enfermidade, com taxa de mortalidade e de incapacidade crônica altíssimas, em torno de 20 milhões de pacientes crônicos e 200.000 óbitos em 2003, valores possivelmente subestimados, pois sintomas relacionados a esquistossomose, como anemia e baixa taxa de crescimento, não podem ser reconhecidos como efeitos da doença (OMS, 2005).

Para a estimativa segura da prevalência da esquistossomose, necessita-se de levantamentos parasitológicos feitos com amostragem adequada em nível nacional, levando em consideração que a prevalência da parasitose não apresenta distribuição regular (Katz & Peixoto, 2000). Estima-se que no Brasil haja em torno de 7 milhões de portadores de esquistossomose e 70 milhões de indivíduos expostos ao risco de contrair a doença (Katz & Peixoto, 2000)

A gravidade que assume a doença em muitos casos e o déficit orgânico provocado faz da esquistossomose um dos mais graves problemas de saúde pública, no âmbito mundial, e uma situação dispendiosa para populações de áreas endêmicas (Katz, 1999).

Para que os elos da cadeia epidemiológica da esquistossomose se juntem e ocorra a transmissão é necessário que o meio ambiente seja favorável e que o homem contribua decisivamente. Outro fator determinante é a presença de hospedeiros intermediários em todo território nacional. No Brasil, essas condições são atendidas plenamente e por isso a doença é tão difundida no país (Amaral & Porto, 1994).

No Brasil a contaminação da água pelo *S. mansoni*, ocorre com facilidade devido a insuficiente cobertura do sistema de esgotamento sanitário e abastecimento de água encanada na maioria dos estados. Convivendo com essas condições de carência extrema de serviços públicos, indispensáveis para um padrão normal de vida saudável, o homem, na maioria das vezes, desconhece devido ao seu despreparo em termos de educação sanitária, que os próprios hábitos podem contribuir decisivamente para lhe causar a esquistossomose. A falta de conscientização da população a respeito da doença é traduzida pelos altos índices de analfabetismo registrados nas regiões endêmicas (Amaral & Porto, 1994).

O controle da esquistossomose deve ser considerado sob dois aspectos, ou seja, o da morbidade e o da transmissão. Para o controle da morbidade, que visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave (hepatoesplênica), o diagnóstico e o tratamento são suficientes, sendo que desde a década de 1980, estão disponíveis duas drogas eficientes, com baixa toxicidade e boa tolerância, administradas em dose única por via oral (Katz, 1999). Já para o controle da transmissão, ideal por visar interromper o ciclo evolutivo do parasito, apenas o tratamento das populações infectadas é insuficiente, sendo necessárias obras de engenharia sanitária, possibilitando o aporte adequado de água para as casas e a adequada eliminação dos dejetos, impedindo que os mesmos contaminem os recursos hídricos, além de obras que modifiquem o meio ambiente (Katz, 1999).

Outra medida importante é a educação para saúde, fazendo com que as populações residentes em zonas endêmicas não apenas tenham consciência do problema, mas que modifiquem o seu comportamento (Katz & Peixoto, 2000).

Conhecer a fauna planorbídica de cada localidade é essencial para combater a esquistossomose, uma vez que o ciclo do trematódeo só se completa na presença do hospedeiro intermediário, sendo necessário a realização de novos levantamentos malacológicos e o monitoramento de criadouros já sabidos como fontes de transmissão dessa doença (Teles, 2005).

3.3. Levantamentos epidemiológicos

A relação antiga *Schistosoma*-homem atingiu um nível de desequilíbrio tão favorável ao parasito já que o homem proporciona aos parasitos adultos proteção física e nutrientes suficientes para que sobrevivam por até mais de vinte anos, inclusive produzindo ovos. Ao lançar os ovos de *Schistosoma* no meio ambiente, o homem favorece a perpetuação e disseminação deste trematódeo (Amaral & Porto, 1994).

As correntes migratórias que se processam, na maioria das vezes de maneira caótica, sem os devidos cuidados sanitários, promovem a dispersão das populações humanas fazendo com que os portadores da esquistossomose disseminem a doença (Amaral & Porto, 1994; Paraense & Corrêa, 1987).

Como os portadores da esquistossomose são na maioria assintomáticos, principalmente aqueles que se dispõe a migrar, fica difícil detectar os focos novos na sua fase inicial, por que mesmo os casos detectados na rede permanente de saúde, através dos exames de fezes de rotina, não são notificados. Outro fator que tem favorecido a expansão da doença é que por falta de recursos, principalmente humanos, o Programa de Controle da Esquistossomose não tem combatido a doença em toda extensão da área endêmica, nem tem exercido vigilância epidemiológica em todas as áreas vulneráveis do país (Amaral & Porto, 1994; Teles, 2005).

Associado a isso a ampliação dos criatórios de qualquer uma dessas espécies de *Biomphalaria* implica em um aumento do potencial endêmico da esquistossomose, exigindo um acompanhamento constante (Silveira et al., 1997).

Segundo Teles (1996) encontra-se maior abundância destes moluscos em meios lóticos, como valas, córregos, ribeirões e rios, quando comparado a ambientes lênticos como açudes, represas, lagoas, aquários domésticos e tanques de culturas. Quanto à vegetação, esta se constitui fator importante, não só na alimentação do gênero *Biomphalaria*, como serve também como substrato para as cápsulas ovíferas (Coimbra Jr. & Santos, 1986). Dentre os ambientes lóticos, os locais mais profícuos são trechos remansos, como brejos, praias e outras reentrâncias, abrigadas e sombreadas por vegetação emergente, portanto, do entornos das margens, com fortes indícios de poluição orgânica, da frequência do homem, com instalações de moradia ou lazer, ou da proximidade de núcleos urbanos (Teles, 1996).

No estado de Rondônia foi realizado levantamento malacológico em 1986, abrangendo 11 municípios e 162 ecossistemas límnicos, sendo que 48% destes habitats apresentaram-se positivos para pelo menos uma espécie de planorbídeo. Dentre as espécies de *Biomphalaria* foram encontradas *B. amazonica*, *B. occidentalis*, além de duas populações de *Biomphalaria* em que não foi possível definir a espécie (Coimbra Jr. & Santos, 1986).

Gazin et al. (2000) verificaram a presença de *B. straminea* em um açude do Sertão de Pernambuco, mesmo o Sertão não sendo uma área endêmica ou focal para esquistossomose, demonstrando que as condições da água são favoráveis para o desenvolvimento desta espécie, o que pode permitir a

introdução da doença no semi-árido, diante da crescente multiplicação de barragens.

No Campus de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, foi realizado um levantamento da malacofauna límnic, tendo sido registrada a presença de *B. glabrata* e *B. straminea*, destacando o desaparecimento de *B. tenagophila*, registrada em levantamento anterior e a introdução de *B. straminea* neste ambiente (Fernandez et al., 2001).

Também no Estado do Rio de Janeiro foi realizado um levantamento malacológico na Mesoregião das Baixadas, tendo sido registrada a ocorrência de *B. tenagophila*, *B. straminea* e *B. schramni* (Thiengo et al., 2002). Em continuidade a avaliação da malacofauna das mesoregiões do Rio de Janeiro, Thiengo et al. (2004) investigou a mesoregião do Norte Fluminense, tendo observado apenas a ocorrência de *B. tenagophila*.

Em Uberlândia, MG, foi realizada avaliação da ocorrência de moluscos planorbídeos na estação de piscicultura do IBAMA, em que foi observada a presença de *B. straminea* em 39,5% dos tanques de criação. Mesmo não havendo nenhum molusco infectado por *S. mansoni*, cabe salientar suscetibilidade desta espécie ao trematódeo, bem como importância de peixes e plantas na dispersão de moluscos (Silveira et al., 1997).

No estado de São Paulo, foi realizado um estudo retrospectivo de 20 anos de coletas de moluscos visando conhecer a distribuição das espécies de *Biomphalaria*. Foram examinados mais de 100 mil indivíduos, sendo relatadas as seguintes espécies: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. schrammi*, *B. intermedia*, *B. oligoza*, e *B. occidentalis*. As coletas das três primeiras espécies foram mais produtivas em ambientes lênticos (Teles, 2005).

A presença de *B. tenagophila* e *B. straminea* por grandes amplitudes geográficas no Estado de São Paulo caracteriza a boa plasticidade e capacidade adaptativa dessas espécies, em que pesem as inevitáveis diferenças de certos parâmetros ambientais, como pH, turbidez, dureza, entre outros, que tradicionalmente constituem fatores limitantes da dispersão e proliferação desse gênero dos organismos aquáticos (Teles, 2005).

Para o estado do Rio Grande do Sul, as espécies de *Biomphalaria* já relatadas são *B. tenagophila* (Paranese, 1959), *B. straminea* (Cunha Neto,

1972), *B. oligoza* (Paraense, 1974), *B. peregrina* (Paraense, 1966), *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984), *B. glabrata* (Carvalho et al., 1998).

Para *Biomphalaria oligoza*, Paraense (1974) cita a ocorrência nos estados de Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo neste estado as cidades de Filipson, Gravataí, Guaíba, Lagoa Vermelha, Mariana Pimentel, Morro Reuter, Nova Petrópolis, Porto Alegre, Santo Antonio, Seival, Tramandaí, Tupanciretã e Viamão.

Paraense (1966) mostra que *B. peregrina* foi encontrada nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal. Esse autor relatou a espécie em 48 municípios no Rio Grande do Sul, representando as diferentes regiões do estado. Já Froes & Lima (1975) relataram *B. peregrina* em 17 municípios diferentes, sendo estes referentes à região central do estado.

Populações de *B. tenagophila guaibensis* foram citadas para Guaíba, Porto Alegre, Tapes, Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande, Arroio Grande, Jaguarão, além de duas localidades uruguaias: Arroyo Salsipuedes Grande e Mercedes (Paraense, 1984).

Fróes & Lima (1975) realizaram um levantamento malacológico em 49 municípios do Rio Grande do Sul, representantes da maioria das regiões fisiográficas do estado (litoral, depressão central, encosta do sudeste, serra do sudeste, planalto médio, alto Uruguai, campos de cima da Serra, encosta superior do nordeste e encosta inferior do nordeste), dentre as espécies de *Biomphalaria* foram identificados como *B. tenagophila*, *B. peregrina*, *B. oligoza* e *B. straminea*.

O primeiro caso autóctone de esquistossomose no Rio Grande do Sul foi relatado por Louzada (1973) no município de São Valentim, próximo a Erechim. A portadora era uma menina de 9 anos, sendo os pais naturais de Medina, MG. No município de São Valentim, na década de 1960, grande número de trabalhadores eram do centro e do nordeste do país, de zonas notoriamente endêmicas da esquistossomose mansonica, com a finalidade de prestar serviços nas obras da barragem do rio Passo Fundo. A região ofereceu as condições indispensáveis para que o miracídio do interior de ovos, provavelmente de alguns trabalhadores que apresentavam a forma crônica ou assintomática da doença, pudesse prosseguir em seu ciclo evolutivo. Segundo

Louzada (1973) a promiscuidade com que viviam os moradores de Vila Alegre (município de São Valentim), a presença de planorbídeos potencialmente transmissores e a presença de pessoas eliminadoras de ovos de *S. mansoni* possibilitou o aparecimento de novos casos de esquistossomose.

O primeiro relato de *B. glabrata* no Rio Grande do Sul está diretamente ligado a alteração do ambiente natural provocada pelo homem, nesse caso, a implantação de uma estação de piscicultura na cidade de Esteio, próximo ao Banhado do Azeite. A população de *B. glabrata* introduzida nesse ambiente adaptou-se as condições locais e permitiu a instalação e fechamento do ciclo do *S. mansoni* nesta localidade, essencialmente pela presença de moluscos suscetíveis e de hospedeiros portadores deste trematódeo. A introdução dessa espécie no Rio Grande do sul está diretamente associada ao transporte de peixes de zonas endêmicas da esquistossomose para localidades livres dessa parasitose (Carvalho et al., 1998). Esta forma de dispersão já havia sido relatada por Carvalho et al. (1987) com *B. straminea* em tanques da Estação de Piscicultura de Furnas (MG), sendo essa espécie não autóctone na área, tendo sido provavelmente introduzidas com peixes originários de outras regiões. Em alguns pontos os moluscos foram encontrados nos arredores, não restritos somente aos tanques de piscicultura, sendo possivelmente dispersos pela água excedente dos tanques. Nesses casos é fundamental investigar a possibilidade da espécie ter sido transportada juntamente com a água na qual são trazidos exemplares de peixes, ou mesmo, pelos próprios peixes. Muito embora não se observe caramujos ou desovas nos recipientes utilizados para o transporte de peixes, é necessário apenas dois meses, após a introdução da espécie, para um grande número de caramujos povoarem intensamente um tanque de piscicultura. Uma das medidas que poderá ser preconizada é a obrigatoriedade de quarentena para os peixes oriundos de zonas infestadas por espécies de planorbídeos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (Correa et al., 1970).

A gravidade do problema, quando envolve espécies vetoras e potencialmente vetoras da esquistossomose, decorre não apenas da importação de novas espécies como também de sua disseminação para novas localidades, graças as Estações de Piscicultura e as particulares, como já pode ser observado no município de Esteio, em relação à identificação de

transmissão focal de *S. mansoni* no Rio Grande do Sul, próximo a uma estação de piscicultura, onde já foram relatados casos autóctones da esquistossomose (Teixeira et al., 1999). Deve ser acrescentado que esta disseminação pode também ser feita através dos rios em cujas margens se localizam os tanques de criação de peixes (Correa et al., 1970). A dispersão de *B. glabrata* de Esteio pelo Rio do Sinos e Lago Guaíba pode representar o estabelecimento definitivo desse planorbídeo no Rio Grande do Sul, necessitando a vigilância e identificação de novos focos de transmissão ativa e a presença de pessoas infectadas com *S. mansoni* no Estado (Teixeira et al., 1999).

A influência da origem geográfica na reprodução de diferentes populações do gênero *Biomphalaria*, baseada na escolha do parceiro para o acasalamento, foi avaliada por Rupp e Woolhouse (1999), sendo observado que os moluscos acasalaram mais frequentemente com indivíduos simpátricos do que com alopátricos, sugerindo que a tendência a evitar o cruzamento interespecífico indique que as adaptações locais são mais vantajosas que a possibilidade de variabilidade genética.

A estivação é um comportamento de certas espécies quando submetidas a determinadas adversidades ambientais. Em relação aos moluscos pulmonados, representa um mecanismo de proteção contra o secamento temporário dos habitats. Com a passagem para o estado de dormência ou quiescência sem perda da vitalidade e, quando ocorre o retorno de condições favoráveis, os indivíduos estivados são capazes de retornar as atividades normais (Teles & Marques, 1989). Estudos sobre a resistência ao ressecamento são muito importantes, principalmente quando associados levantamentos malacológicos em programas de controle da esquistossomose, pois se pode subestimar as avaliações densitárias e o potencial transmissor dessas populações, bem como reduzir a eficácia de aplicações de moluscidas. Teles & Marques (1989) avaliaram exemplares estivados coletados em levantamentos malacológicos de três localidades de São Paulo (nos municípios de Ubatuba e Conchas), tendo sido observado que após 24 horas, em média, todos exemplares exibiam vitalidade e alguns efetuavam posturas. Segundo esses autores essa característica etológica permite que à medida que as condições se tornam favoráveis ao repovoamento e a permanência de portadores humanos da esquistossomose repõe rapidamente

os riscos de contato, bem como favorecer a ampla distribuição geográfica as espécies dotadas dessa habilidade.

Kloos et al.. (2004) avaliaram a distribuição de *B. glabrata* em diferentes habitats em área rural do Vale do Jequitinhonha (MG), tendo observado que as maiores densidades de *B. glabrata* foram observadas em reservatório de água para irrigação, mananciais, canais e poços. A densidade de moluscos nos diferentes habitats foi maior na estação quente e chuvosa significativamente, associado à presença de peixes, poluição e densidade de vegetação.

Outro fator epidemiológico importante na disseminação do *S. mansoni*, dentro de áreas endêmicas, é o crescente turismo rural, onde ocorre uma forma silenciosa e imperceptível de transmissão deste parasito (Enk et al., 2004).

3.4. Suscetibilidade de populações

A adaptação parasito-hospedeiro intermediário em esquistossomose é um problema epidemiológico que merece atenção, com isso outras espécies de *Biomphalaria*, além das espécies já conhecidos como vetores, tem sido testadas para verificar a suscetibilidade ou não ao *S. mansoni* (Souza et al. , 1988).

A suscetibilidade ao parasito tem forte componente genético, oferecendo um potencial para investigação das interações entre parasito e hospedeiro em nível molecular, talvez conduzindo a um novo caminho para o controle (Jones et al., 1999).

A suscetibilidade de *B. tenagophila*, proveniente do Vale do Rio Paraíba do Sul, foi investigada através da exposição dos moluscos a linhagem silvestre (S) e linhagem humana (H) de *S. mansoni*. As *B. tenagophila* infectadas com linhagem silvestre apresentaram menor índice de mortalidade, quando comparadas à linhagem humana, e completou o desenvolvimento até a liberação de cercárias. No 70º dia após a infecção todos os moluscos expostos a linhagem humana foram encontrados mortos, sendo essa população uma ineficiente hospedeira para a linhagem humana de *S. mansoni* (Bastos et al., 1984).

Fernandez (1997) usando *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* expostas a miracídeos simpátricos de *S. mansoni* com 1, 2 e 3 meses de idade, pode observar um declínio de suscetibilidade em *B. glabrata* e um aumento de *B. tenagophila* em relação à idade, já em *B. straminea* não houve diferença significativa do índice de infecção.

Fernandez & Pieri (2001) avaliaram a infecção de *S. mansoni* em *B. straminea* nos quatro primeiros meses de vida e observaram que a suscetibilidade para *S. mansoni* varia com a idade do molusco à exposição, sendo o índice de infecção mais alto em moluscos imaturos do que em maduros. Essa alta suscetibilidade em moluscos jovens pode estar associada à imaturidade do sistema imune (Dikkeboom et al., 1985), mas varia de acordo com a espécie.

De acordo com Michelson & Dubois (1978) populações refratárias apresentam diferentes índices de suscetibilidade, quando submetidas à infecção experimental em moluscos recém desovados.

Biomphalaria peregrina é considerada uma espécie potencialmente transmissora de *S. mansoni*. Paraense e Correa (1973) fizeram o primeiro relato de suscetibilidade de *B. peregrina* à infecção experimental por *S. mansoni* em duas diferentes populações de *B. peregrina*, sendo uma procedente de Lapa (RJ) e outra do Equador. Nesse mesmo estudo foi verificada a resistência de uma população de *B. peregrina* proveniente do município de Pouso Alegre (MG), demonstrando a importância da variação populacional para estudos de suscetibilidade.

Posteriormente Souza et al. (1988) avaliaram uma população de *B. peregrina* de Santa Rita do Sapucaí, MG, através de infecção experimental com três diferentes cepas de *S. mansoni* (SJ, AL, LE), isoladas de Belo Horizonte (MG), São Jose dos Campos (SP) e Alagoas, respectivamente, e mantidas em laboratório há vários anos. Não constataram a presença de cercárias ou esporocistos de *S. mansoni*, mostrando a resistência dessa população ao *S. mansoni*. Anteriormente em um município vizinho, na cidade de Pouso Alegre (MG), Paraense & Correa (1973) já haviam isolado uma população dessa espécie resistente à infecção por *S. mansoni*.

Outra espécie potencialmente vetora de *S. mansoni*, sendo suscetível a esse trematódeo em condições de laboratório, é *B. amazonica* (Correa &

Paraense, 1971). Esses autores relataram a suscetibilidade de uma população de *B. amazonica* da Ilha do Careiro (AM) a duas diferentes cepas de *S. mansoni*, uma proveniente de Belo Horizonte (BH) e outra de São Jose dos Campos (SJ), cepas também utilizados no experimento realizado por Souza et al. (1988). Diferentemente do observado por Souza et al. (1988) *B. amazonica* mostrou-se suscetível ao *S. mansoni*, apresentando índice de infecção de 48% para cepa BH e 73% para cepa SJ. Paraense & Correa (1985) avaliaram a suscetibilidade de uma população de *B. amazonica* de Porto Velho (RO) ao *S. mansoni* e observaram 3,5% de taxa de infecção, resultado muito inferior ao observado pelos mesmos autores (1971) na população de Careiro (AM).

O mecanismo interno de defesa de *Biomphalaria* sp. durante a infecção por *S. mansoni* é ativado e mediado por células efectoras do sistema imune conhecidas como hemócitos. A característica de resistência/suscetibilidade a infecção por *S. mansoni* é geneticamente determinado e, através da análise comparativa dos perfis de transcrição da região ETS, indicam que a exposição ao parasito induz a uma resposta metabólica ativa nos hemócitos (Raghavan et al., 2003).

As espécies de *B. straminea* e *B. tenagophila* apresentam período pré-patente longo, uma vez que naturalmente ocorre atraso ao desenvolvimento da infecção por *S. mansoni*. Com isso as técnicas tradicionais de exposição à luz e esmagamento entre lâminas são menos sensíveis para detectar esse trematódeo em espécies com menor suscetibilidade, devido ao longo tempo gasto e a mortalidade dos moluscos (Jannotti-Passos & Souza, 2000). Essas autoras utilizaram a técnica de LS-PCR (PCR de baixa estrigência) e de exposição à luz para diagnosticar a infecção por *S. mansoni* em *B. tenagophila* e *B. straminea*, demonstrando que a LS-PCR mostrou-se mais sensível na detecção da infecção, sendo detectado o DNA do parasito após sete dias de infecção, possibilitando a detecção precoce de focos de transmissão, em áreas endêmicas, antes do início da eliminação de cercárias.

Analisando estas relações esquistossomo-hospedeiro invertebrado, pode-se admitir que o padrão genético do molusco é o fator de maior influência na suscetibilidade destes animais às infecções esquistossomáticas estudadas (Bastos et al., 1984). Em avaliações de comportamento e reprodução frente à infecção por *Schistosoma* sp. foi observado que moluscos acasalam-se mais

frequentemente com animais sadios do que com infectados, tendo a seguinte hipótese genética: a suscetibilidade é determinada geneticamente e moluscos infectados são, portanto, parceiros menos atrativos (Rupp & Woolhouse, 1999). Associado a isso, está o fato de moluscos infectados serem menos fecundos, o que diminui a atratividade feminina para deposição de esperma; esses fatores associados diminuem o número de acasalamentos entre moluscos infectados (Rupp & Woolhouse, 1999).

3.5. Métodos moleculares

A identificação de planorbídeos é realizada através da dissecação e exame de caracteres morfológicos e anatômicos, da característica de concha, rádula, órgãos do aparelho reprodutor e renal. Um dos fatores mais relevantes para a identificação de espécies do gênero *Biomphalaria* é a habilidade do investigador em dissecar os moluscos e identificar as diferenças morfológicas entre as espécies. Outros fatores que dificultam a identificação são as variações encontradas nos caracteres utilizados, as variações individuais e as modificações e distensões musculares causadas no momento da fixação (Paraense, 1975).

Estudos moleculares de diversos hospedeiros invertebrados foram iniciados na tentativa de compreender o gene cuja expressão pode influenciar o desenvolvimento dos parasitos, com isso espera-se esclarecer tanto a expressão do gene do parasito quanto do hospedeiro, podendo eventualmente conduzir a métodos inéditos para o controle das doenças (Knight et al., 2000). No mínimo, uma compreensão melhor da constituição molecular do invertebrado e hospedeiro deve revelar importantes informações sobre a variação genética e importantes resultados para a epidemiologia da doença (Knight et al., 2000).

Comparado com o detalhamento genético dos estudos moleculares conduzidos em insetos que são hospedeiros invertebrados, os resultados relacionados à *B. glabrata* estão ainda no início. Algumas informações genômicas básicas sobre *B. glabrata* são conhecidas, entretanto, onde ainda existem lacunas no conhecimento, a informação pode ser inferida através de dados referentes a espécies relacionadas (Knight et al., 2000).

Inicialmente os estudos genéticos de *B. glabrata* foram incitados em parte por modelos largamente divergentes de compatibilidade, muitas vezes observado entre parasita e molusco. Acredita-se que a interação entre os genes do parasita e do hospedeiro influenciam no resultado da infecção, com a existência de relações de maior compatibilidade onde ocorreu uma extensa co-evolução (Knight et al., 2000).

Técnicas moleculares também são utilizadas para moluscos de interesse médico-sanitário; incluindo pesquisa com *Bulinus africanus* (Stohard et al., 2002), da família Lymnaeidae (Bargues et al., 2001), gênero *Lymnaea* (Stothard & Kristewsew, 2000; Magalhães et al., 2004; Cardoso et al., 2006), além de *Biomphalaria* (Vidigal et al., 2000b; Vidigal et al., 2001; Tuan et al., 2001; Caldeira et al., 2002).

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na amplificação específica de uma região do DNA pela PCR, com posterior digestão do produto com enzimas de restrição, esses produtos podem ser visualizados após eletroforese. Essa técnica foi utilizada, com sucesso, na identificação das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria* (Vidigal et al., 1998b, Caldeira et al. 1998, Spatz et al., 1999, Vidigal et al., 2000a). Os autores amplificaram a região espaçadora interna do gene do rRNA, constituído de três regiões conservadas 18, 5.8 e 28S, além de duas regiões espaçadoras (ITS1 E ITS2).

A dificuldade na diferenciação de *B.t. tenagophila*, *B.t. guaibensis* e *B. occidentalis* através de características da concha e morfológica dos órgãos do sistema genital, associada à extensa heterogeneidade intraespecífica e falta de informação sobre o isolamento reprodutivo entre *B.t. guaibensis* com *B.t. tenagophila* e *B. occidentalis* motivou estudos moleculares para compreender a relação entre estas espécies (Spatz et al., 1998). Spatz et al. (1998) utilizaram o PCR-RFLP com sete enzimas de restrição diferentes (*AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *MnII*, *HpaII*, *HfaI*, *RsaI*) e observaram que a *AluI* identifica e diferencia as espécies *B.t. guaibensis*, *B.t. tenagophila* e *B. occidentalis*, sendo que *B.t. tenagophila* apresenta perfil mais heterogêneo, mostrando algumas bandas polimórficas quando comparadas populações do Brasil e da Argentina. Os perfis obtidos com as mesmas sete enzimas estimaram a similaridade entre essas espécies, sugerindo, através da análise do agrupamento, que *B.t. guaibensis* é mais intimamente relacionado à *B. occidentalis* do que com *B.t.*

tenagophila, indicando que *B.t. guaibensis* e *B. occidentalis* podem ser consideradas como táxons irmãos (Spatz et al., 1999).

No primeiro relato de *B. glabrata* no Rio Grande do Sul, foram identificados na mesma localidade *B. occidentalis* e *B. tenagophila guaibensis* (Carvalho et al., 1998), demonstrando que essas espécies podem compartilhar os mesmos habitats, sem haver competição entre si. Com isso destaca-se a importância da identificação molecular de moluscos *Biomphalaria*, pois através da técnica de PCR-RFLP foi possível identificar o perfil específico de *B. tenagophila guaibensis*, com padrão de bandas muito diferente do observado em *B. glabrata* (Vidigal, 2000b), permitindo afirmar com certeza a espécie identificada.

Baseado também na grande similaridade morfológica entre as espécies *B. kuniana*, *B. intermedia* e *B. peregrina* com *B. straminea*, Paraense (1988) propôs o complexo *B. straminea*. Técnicas isoenzimáticas foram utilizadas anteriormente por Hoffman (1987) e Pointier et al. (1993), mas apresentavam certas limitações, como a necessidade muito material biológico e análise de pequeno número de *loci*. Caldeira et al. (1998) utilizaram o PCR-RFLP para diferenciar essas espécies e estimar a distância genética entre as mesmas. Dentre as enzimas usadas (*AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *DdeI* e *MnII*) a *DdeI* apresentou melhor perfil para separação das espécies de molusco. Com isso sugere-se que *B. intermedia* é mais relacionada com *B. straminea* e *B. kuhniiana* do que com *B. peregrina*.

Estudo semelhante foi desenvolvido por Spatz et al. (2000) para as espécies *B. oligoza*, *B. orbigny* e *B. peregrina* obtidas de diferentes localidades da Argentina, Brasil e Uruguai. Através da técnica de PCR-RFLP, o melhor perfil para identificação das três espécies é o obtido através da restrição com a enzima *MvaI*. O percentual de bandas compartilhadas entre todos os possíveis pares é de 54%.

Para estudar a variabilidade genética de *B. straminea*, *B. intermedia* e *B. khuniana*, espécies pertencentes ao complexo *B. straminea*, foi utilizado o SSR-PCR com os *primers* (CA)₈RY e K7. Foi observado que os indivíduos mais relacionados pertencem a mesma espécie e localidade, e os indivíduos de diferentes localidade, mas de mesma espécie, apresentaram clara heterogeneidade. As árvores geradas, usando método UPGMA, mostraram

similar topologia, indicando que a técnica é muito eficiente para estudos intraespecífico e intrapopulacional do complexo *B. straminea* (Caldeira et al., 2001).

Microsatélites, também chamados de Repetições de Sequências Simples (SSR- simple sequence repeat), são sequências curtas de DNA, contendo no máximo repetições de 6 pb e comprimento total geralmente não excedendo a 200 pb. São classificados segundo a estrutura da sua repetição. Apesar de já terem sido identificados microsatélites contendo todas as combinações possíveis de nucleotídeos, as repetições (CA)_n, depois das repetições A_(n), são as mais abundantes e parecem estar presentes em todos os eucariotos com número de cópias estimado de 50.000 a 100.000 elementos por genoma haplóide. Regiões contendo SSRs são amplificadas através da PCR utilizando-se um par de iniciadores específicos que flanqueiam o microsatélite (Campos, 2001).

Os microsatélites, sendo loci altamente polimórficos, podem ser usados para estudos de estruturas de populações e características evolutivas *B. glabrata*. Jones et al. (1999) relataram o isolamento e a caracterização do primeiro loci microsatélite de *B. glabrata*, e concluíram que *B. glabrata* da América do Sul tem maior afinidade com espécies africanas do que outras espécies neotropicais, sendo *B. tenagophila* a mais distante. Além disso, sugere-se que as espécies africanas são mais novas do que seus congêneros neotropicais, com a linhagem *B. pfeifferi*-*protoglabrata*, altamente conservada, estima-se que tenham evoluído da África neotropical há 2,3-4,5 milhões de anos em consequência da dispersão transatlântica anterior nas Américas. Consequentemente, esses marcadores podem ser mais úteis para examinar a estrutura demográfica de espécies africanas do que as neotropicais.

As populações do gênero *Biomphalaria* normalmente apresentam uma baixa variabilidade genética intrapopulacional, em oposição a isso é observado uma alta variabilidade interpopulacional, atribui-se isso ao baixo fluxo gênico entre as populações, permitindo uma evidente diferenciação entre essas. Já baixa variabilidade intrapopulacional pode estar relacionada a pressões ambientais, que induzem a mecanismo de dormência como estivação, diapausa ou hibernação (Caldeira, 1999).

A ausência ou o baixo fluxo gênico entre as populações de *Biomphalaria* permite o desenvolvimento de linhagens e parece influenciar os níveis de suscetibilidade ao *S. mansoni*. Os diferentes níveis de reprodutividade são observados no cruzamento entre populações de *B. glabrata* geograficamente distintas (Paraense & Deslandes, 1959), indicando o grau de variação intraespecífica e ao papel notável do isolamento geográfico na evolução dos planorbídeos. Vários estudos genéticos foram realizados, como o de Campos et al. (2002), que avaliaram a técnica de SSR-PCR (*primers* (CA)8RY e K7) para determinar a variabilidade genética de oito populações brasileiras distintas de *B. glabrata*. Foi observado que a variabilidade genética foi maior entre populações do que dentro da população, as populações de moluscos de laboratório e de campo não apresentaram quase nenhuma diferença genética e nenhuma relação entre a variabilidade genética e a distância geográfica foi observada. Com isso foi possível concluir que o SSR-PCR é um bom instrumento molecular alternativo em estudos populacionais de *B. glabrata*.

Mavárez et al. (2000) observaram a variação de microssatélites de *B. glabrata* em duas populações da Venezuela Central. A heterozigose observada variou de 0 (locus BgE1) a 0,31 (locus BgE2) na mesma localidade (La Cuarta). Os loci BgE2, BgE3, BgE5 e BgE6 apresentaram significativa deficiência heterozigótica e isso ocorre mais provavelmente devido a auto-fecundação. Também foi testado o desequilíbrio genotípico em 40 situações (pares de loci de cada população), sendo observado que apenas quatro pares apresentaram desvios significantes das expectativas casuais, mas nenhum foi significativo após a correção de Bonferroni. Em conclusão, no mínimo oito loci microssatélites polimórficos são apropriados para estudos de estruturas de populações e sistemas reprodutivos em populações naturais de *B. glabrata*.

RAPD é uma técnica variante da PCR que, ao contrário das técnicas que utilizam iniciadores específicos, não requer o conhecimento prévio da sequência do DNA do organismo em estudo (Campos, 2001). Geralmente se utiliza iniciador único de sequências aleatórias em condições de baixa estrigência de anelamento. Isto permite a ligação dos iniciadores a múltiplos sítios do genoma, amplificando segmentos anônimos sem correlação obrigatória com regiões transcritas ou não, repetitivas ou não, variáveis ou conservadas. Esse procedimento possibilita a produção de perfis de bandas

que refletem a constituição geral do genoma, permitindo estimar a semelhança genética entre os organismos estudados, possibilitando analisar a variabilidade genética entre os organismos (Campos, 2001).

A técnica de RAPD tem sido utilizada para estudos epidemiológicos entre organismos correlacionados ou para diferenciar populações de uma mesma espécie, detectando polimorfismos. O perfil das bandas geradas é o resultado da hibridação do *primer* a seqüências específicas e da amplificação da região flanqueada por estas. A análise visual dos esferogramas possibilita a diferenciação entre populações. A variabilidade genética foi avaliada entre populações de *B. glabrata* (Vidigal et al., 1994), *B. pfeifferi* (Hoffman et al., 1998), entre populações suscetíveis e resistentes de *B. tenagophila* a *S. mansoni* (Abdel-Hamid et al., 1999).

Segundo Abdel-Hamid et al. (1999) a amplificação aleatória do DNA, através da técnica de RAPD, representa um eficiente caminho para a comparação dos genomas, desde que os marcadores moleculares sejam detectados como variantes genéticos entre os moluscos susceptíveis e não susceptíveis.

Vidigal et al. (1994) avaliaram a variação genética de *B. glabrata* em sete populações brasileiras através da técnica de RAPD. Os perfis de RAPD de moluscos de uma mesma população foram relativamente homogêneos, com a maioria das bandas que são comuns a todos os indivíduos estudados. Em contraste, os perfis de moluscos de populações diferentes são bastante distintos, com menos de 10% de fragmentos de DNA amplificados são comuns a todos os espécimes estudados. Isso foi observado independente do *primer* utilizado, indicando que heterogeneidade genética de *B. glabrata* é notável e segundo estes autores a grande variedade de marcadores genéticos polimórficos indica que a análise de RAPD pode ser uma importante contribuição para os estudos genéticos de *Biomphalaria*.

Nove populações da Ilha de Guadalupe, França, foram estudadas usando marcadores RAPD (Langand et al., 1999). Foi observada uma grande e significativa diferença de polimorfismo genético entre as nove populações estudadas em área restrita de 45 km e uma significativa correlação entre a diferença genética e a distancia geográfica. Também foi observada uma

pequena, mas significativa diferença entre os grupos provenientes do sul ou do norte da ilha.

Devido ao alto índice de polimorfismo observado em *B. glabrata* na técnica de RAPD, o uso dessa técnica para a identificação de espécie seria pouco recomendado, com isso testada a técnica de LS-PCR (PCR de baixa estringência) com uso de dois *primers* específicos (NS1 e ET1) e condições de baixa estringência de anelamento. Mesmo que esses *primers* produzam complexos padrões de bandas, pelo menos quatro produtos LS para *Biomphalaria* foram espécie-específico, independente da origem dos moluscos (Vidigal et al., 1996).

Biomphalaria tenagophila e *B. occidentalis* são dificilmente distinguíveis em relação aos caracteres morfológicos, mas apenas *B. tenagophila* é hospedeira intermediária de *S. mansoni*. A identificação dessas espécies é fundamental para estudos epidemiológicos sobre esquistossomose. Através da técnica de LS-PCR é possível observar perfis diferentes de *B. tenagophila* e *B. occidentalis*, sendo a técnica de LS-PCR aplicável a identificação dessas espécies quando a morfologia clássica é inconclusiva (Pires et al., 1997).

4. Material e métodos

4.1. Obtenção dos moluscos

Os moluscos foram coletados utilizando-se tamis metálico ou plástico percorrendo-se o fundo e margens dos criadouros. O material obtido foi minuciosamente examinado e os moluscos presentes transferidos, com auxílio de pinça, para potes plásticos com água e vegetação da localidade. Foram coletados em lagoas, canais de irrigação, açudes, córregos e locais lodosos. Após foram transportados ao laboratório juntamente com água, vegetação ou lodo em que foram encontrados.

Foram utilizados moluscos do gênero *Biomphalaria*, coletados durante o ano de 2005 em diferentes municípios e localidades do Sul do Rio Grande do Sul conforme Fig. 3 e Tab. 1.

4.2 Caracterização dos ambientes

Os ambientes observados foram agrupados em categorias diferentes, com objetivo de diferenciar e caracterizar cada um dos habitats. Com isso os tipos de ambientes límnicos pesquisados foram:

→ Açudes – construção destinada a represar águas para fins de irrigação ou criação de animais, podendo ser alimentados por um curso de água de pequeno ou médio porte ou pela água das chuvas.

→ Canais de irrigação – grandes canais cuja função é conduzir a água de alguma fonte natural para o interior das lavouras e distribuí-las para os canais secundários, normalmente são bastante largos para ter vazão elevada de água e os acompanha normalmente uma estrada de cada lado.

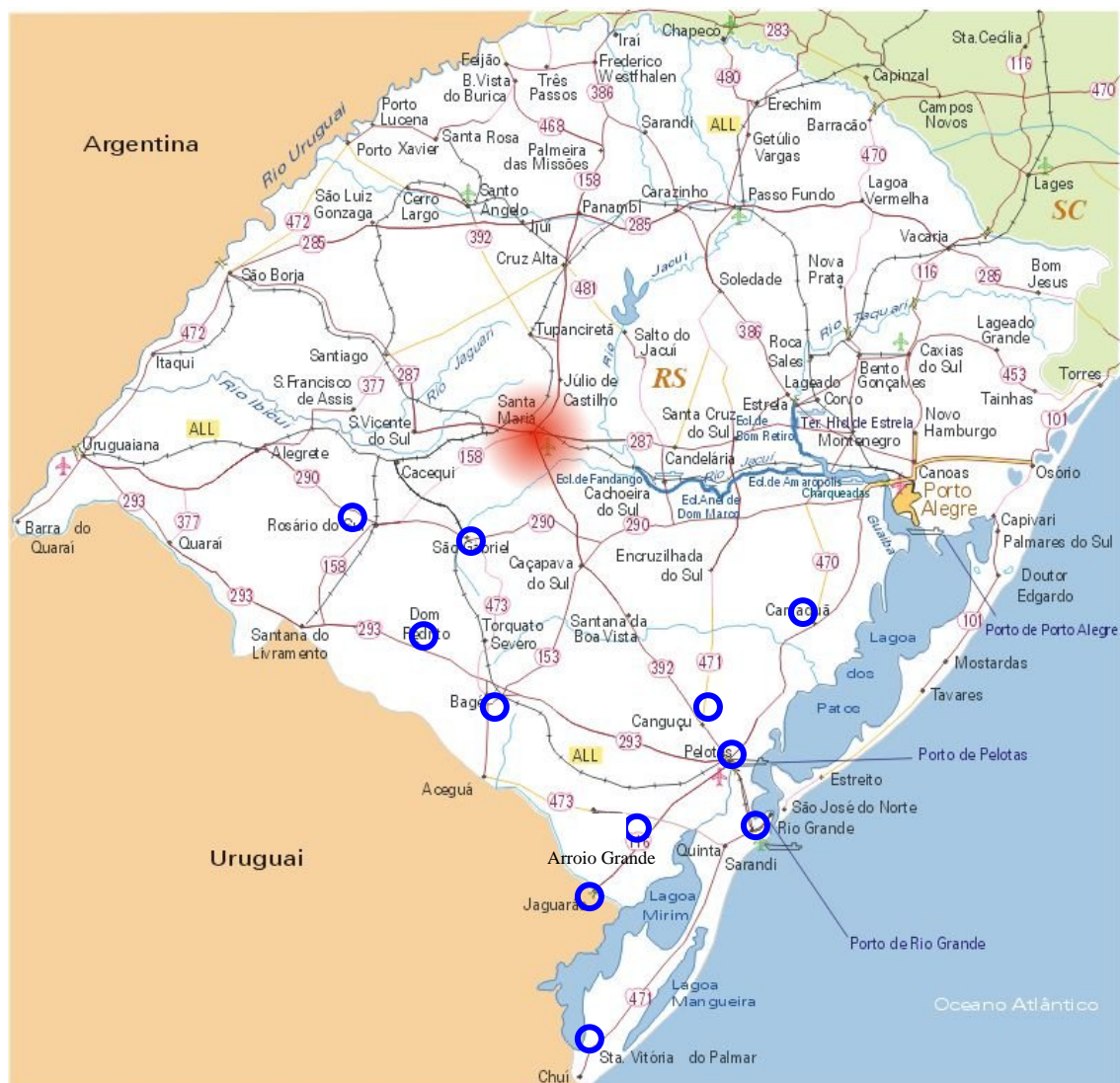


Figura 3 – Municípios (○) onde foram realizadas as coletas de *Biomphalaria* no sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Fonte: http://www.camara.gov.br/alceucollares/imagens/rs-mapa_mini.jpg

Tabela 1 – Município e as respectivas localidades onde foram coletadas as diferentes populações de *Biomphalaria* spp.

MUNICÍPIO	LOCALIDADE
Arroio Grande	Barragem Chasqueiro
Bagé	EMBRAPA CPPSul*
Camaquã	Pacheca
Canguçu	Cabanha Cafundó
Capão do Leão	Fazenda Bela Vista
Dom Pedrito	Passinho do amor
Dom Pedrito	Chácara do Cedro
Dom Pedrito	Estrada do Meio
Jaguarão	Granja Bretanha
Pelotas	Barragem SANEP**
Rio Grande	Rio Grande
Rosário do Sul	Estância Santa Ambrosina
Santa Vitória do Palmar	Estância Ipiranga
Santa Vitória do Palmar	Granja Figueira
São Gabriel	FEPAGRO- Forrageiras***

* EMBRAPA-CPPSul - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Pecuária Sul; ** SANEP - Serviço Autônomo de Saneamento de Pelotas; *** FEPAGRO-Forrageiras – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisas de Forrageiras.

→ Canais secundários de irrigação – canais secundários de irrigação presentes em lavouras de arroz, tendo origem no canal principal de irrigação, cruza o terreno utilizando-se de manilhas, atravessando toda extensão da lavoura; sua função é de distribuir a água de irrigação por toda lavoura ou drená-la quando desejar deixá-la seca.

→ Córrego – sulco aberto pelas águas correntes de alguma coleção de água próxima, podendo ser essa natural ou artificial.

4.3 Manutenção e criação de moluscos em laboratório

Os moluscos foram transportados em recipientes plásticos de 12cm x 9cm até o Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel, onde foram transferidos para

caixas plásticas de 43x28x15 cm contendo água desclorada, sendo alimentados com alface fresca e/ou desidratada, a temperatura ambiente. A reposição de água desclorada foi realizada a cada dois dias.

4.4. Obtenção da geração F1 dos moluscos

Das populações de campo que se reproduziram no Laboratório de Helmintoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, ou seja, realizaram posturas, foram obtidos novas populações de caramujos (F1). Todos provenientes de posturas realizadas já em condições de laboratório, e colocados em novos recipientes plásticos, conforme Fig. 4. Com o crescimento dos moluscos, estes foram transferidos para aquários de maiores dimensões, sendo realizadas troca periódica (em dias alternados) da água desclorada, pois não estavam expostas a aeração constante e água corrente.

4.5 Identificação morfológica dos moluscos

A identificação morfológica dos moluscos do gênero *Biomphalaria* foi realizada no Laboratório de Helmintoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, sendo baseada na comparação das características das conchas, anatomia dos órgãos reprodutivos e características do tubo renal de cinco exemplares de cada população, segundo Paraense (1975). Cinco moluscos foram colocados em solução anestésica (Hypnol 3%) para relaxamento durante 6 a 8 horas e, após, sacrificados através de choque térmico. O fragmento da região cefalopodal foi retirado para análise molecular, sendo armazenado a -70°C, e o restante do corpo mantido em fixador Raillet-Henry. Os caracteres morfológicos foram observados em lupa e comparados entre as características de outras espécies.



Figura 4 – Geração de F1 de *Biomphalaria* obtida em condições de laboratório.

4.6 Identificação molecular dos moluscos

4.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir da região cefalopodal das diferentes populações de *Biomphalaria* spp., através do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) (Vidigal et al. 2000a) no Laboratório de Helminthoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Inicialmente adicionou-se 200 µl de solução de lise nuclear e 1 µl de proteinase K à região cefalopodal, separada anteriormente, e incubados a 37°C *overnight*. Após adicionou-se 80µl de solução de precipitação protéica, agitando por 20 a 30 segundos com auxílio de vortex, seguido de centrifugação a 11.600 g por três minutos, com formação de *pellet*. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo, sendo então adicionado 200 µl de isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCCH}_3$) e homogenizado, por inversão, durante 20 minutos e centrifugado por seis minutos a 11.600 g. Ao *pellet* foram feitas duas lavagens com etanol, a primeira com 500µl etanol 100% e 10µl de acetato de sódio 3M (-70°C por 2 horas) e a segunda com 500µl de etanol 70%, ambas seguidas por centrifugação de 10 minutos a 11.600 g. Ao *pellet* foi adicionado 25µl de solução de reidratação e estocado a -20°C.

4.6.2 PCR-RFLP

A caracterização molecular das diferentes espécies de *Biomphalaria* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP de acordo com Caldeira et al. (1998).

Foram amplificadas as regiões ITS, que incluem o gene da subunidade 5.8S do rDNA e os espaços transcritos ITS1 e ITS2, através dos iniciadores ETTS1 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') e ETTS2 (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'), respectivamente ancorados com as extremidades conservadas do gene ribossomal de 18S e 28S, de acordo com Kane & Rollinson (1994).

A técnica de PCR consistiu da reação, conforme tab. 2:

Tabela 2 – Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na reação de PCR.

REAGENTE	VOLUME (µl)
H ₂ O	4,6
dNTPs (2mM)	1,0
Tampão	1,0
MgCl ²⁺ (50 mM)	0,3
ETTS1 (500µmol)	1,0
ETTS2 (500µmol)	1,0
Taq DNApolimerase (Invitrogen) (5U/µl)	0,1
DNA (amostra)	1,0
Total	10,0

O protocolo utilizado para PCR foi: desnaturação inicial de três minutos a 95°C, seguida de 33 ciclos, que correspondem a desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por dois minutos; seguida por uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, sendo posteriormente corados pela prata. O padrão de peso molecular utilizado foi Phi X 174 digerido com endonuclease HaeIII

O produto de PCR foi clivado com a enzima de restrição *DdeI*, que cliva as regiões 5'-C↓TNA G-3' e 3'G ANT↑C-5'. O produto amplificado foi diluído em 23µl de H₂O e retirado uma alíquota de 10µl. Foi adicionada a cada amostra 0,3µl de *DdeI* e 1,0µl de tampão de enzima específico, e submetido a 37°C por três horas e 30 minutos. Após, para retirada da enzima restante, foi adicionado o 13µl de fenol-clorofórmio, homogenizado e centrifugado por dois minutos. Retirou-se o sobrenadante e transferiu-o para outro tubo.

Após foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corado com prata para visualização de perfis e comparação com os descritos por Vidigal et al. (2000b), conforme figura abaixo (Fig. 5). O padrão de peso molecular utilizado foi Phi X 174 digerido com endonuclease HaeIII

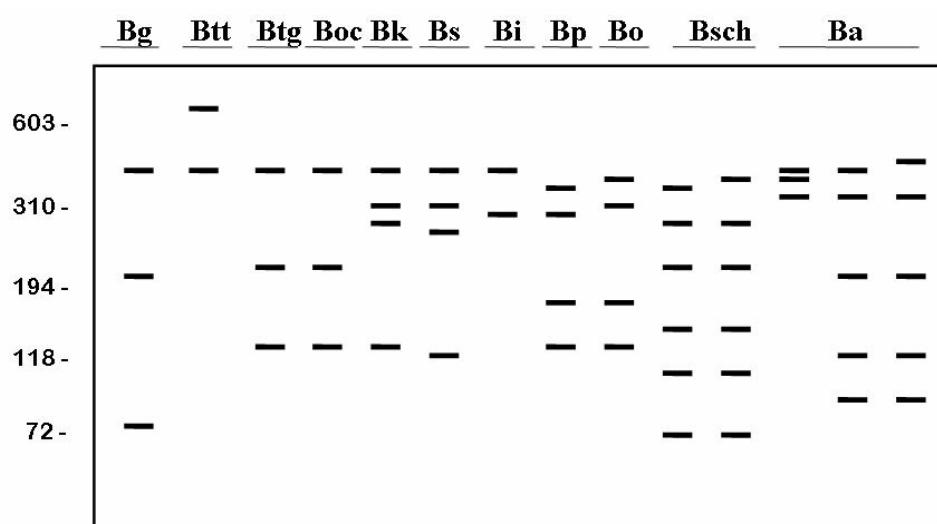


Figura 5 - Diagrama representativo dos perfis espécie-específicos das dez espécies e uma sub-espécie brasileira do gênero *Biomphalaria*. Bg – *Biomphalaria glabrata*; Btt – *Biomphalaria tenagophila tenagophila*; Btg – *Biomphalaria tenagophila guaibensis*; Boc – *Biomphalaria occidentalis*; Bk – *Biomphalaria kuhniana*; Bs – *Biomphalaria straminea*; Bi – *Biomphalaria intermedia*; Bp – *Biomphalaria peregrina*; Bo – *Biomphalaria. oligoza*; Bsch – *Biomphalaria schrammi*; Ba – *Biomphalaria amazônica*.

Fonte: Vidigal et al., 2000b

Após a amplificação do DNA e corte com enzima *DdeI* de todos os moluscos sacrificados, foram selecionados aleatoriamente dois exemplares de cada população, para visualização em única eletroforese, com objetivo de demonstrar as diferenças e similaridades entre os moluscos.

4.7 Infecção experimental de *Biomphalaria* com *S. mansoni*

A infecção experimental foi realizada em caramujos da geração F1 de duas populações de *B. peregrina* dos municípios de Rio Grande (Rio Grande) e Dom Pedrito (Estrada do Meio); como controle da infecção foram utilizados exemplares de *B. glabrata*, da localidade de Barreiro de Cima, população mantida no moluscário do Centro de Pesquisas René-Rachou/Fiocruz. A cepa de *S. mansoni* utilizada foi LE, a qual é mantida no biotério do René-Rachou/Fiocruz. Para eclosão dos miracídios, os ovos de *S. mansoni* foram expostos à luz incandescente por 20 a 60 minutos. A contagem dos miracídios foi feita retirando-se duas alíquotas de 1ml e colocando em lâmina escavada e observado ao estereoscópio. A infecção foi realizada como descrito na tab. 3.

Tabela 3 – Infecção experimental de duas populações de *B. peregrina* e uma população de *B. glabrata* (controle) para avaliação da suscetibilidade à cepa LE de *Schistosoma mansoni*

Numero de moluscos	Espécie de molusco	Procedência da população	Diâmetro em mm	Número de miracídios/molusco
50	<i>B. peregrina</i>	Dom Pedrito	4-6	100
50	<i>B. peregrina</i>	Rio Grande	4-6	100
50	<i>B. glabrata</i>	Barreiro de Cima	8-10	20

Em cada orifício da placa de cultivo celular, com capacidade de 2,5 ml, foi colocado um molusco com o respectivo número de miracídios, sendo o volume total do orifício preenchido com água desclorada. Os moluscos permaneceram em contato com os miracídios durante seis horas, sob luz incandescente, conforme Fig. 6. Após a infecção os moluscos foram transferidos para novos aquários, com aeração constante, água corrente e temperatura de $\pm 27^{\circ}\text{C}$. O intervalo da avaliação da infecção foi de 30, 35 e 40 dias.

Como controle negativo foram utilizados 20 exemplares de cada uma dessas populações acima citadas, sem infecção.



Figura 6 – Exposição à luz incandescente para infecção dos moluscos *Biomphalaria peregriana* e *Biomphalaria glabrata* por miracídios de *Schistosoma mansoni* (cepa LE), dispostos individualmente em placas de cultivo celular.

4.8 Avaliação da suscetibilidade de *Biomphalaria peregriana* ao *S. mansoni*.

A suscetibilidade destas populações foi investigada através da exposição à luz e por esmagamento. Após 30 dias de infecção, os caramujos foram colocados individualmente em Becker com água desclorada a 28°C e exposto à luz incandescente 30 a 40 minutos. Após observou-se, em estereomicroscópio, cada um dos recipientes para identificar a presença de cercarias na água. Os moluscos positivos foram retirados da colônia. Aos 35° e 40° dia foi realizado o mesmo procedimento, conforme Fig. 7:

Além desta análise, após 43 dias foi realizado o esmagamento entre lâminas de vidro dos moluscos restantes. Essa técnica consiste na colocação de moluscos entre duas lâminas de vidro e posterior esmagamento. O material foi levado ao microscópio, para observação da presença de esporocistos e cercárias. A taxa de infecção foi estimada através do número de moluscos positivos multiplicado por 100 e dividido pelo total de moluscos examinados. Ambas as técnicas realizadas foram baseadas em Souza & Lima (1997).



Figura 7 – Exposição dos moluscos à luz artificial incandescente para eliminação de cercárias, para verificação da infecção por *Schistosoma mansoni*.

5. Resultados

5.1. Identificação morfológica

A partir da análise dos caracteres morfológicos de cinco exemplares de cada população foram identificadas três espécies de *Biomphalaria*: *B. oligoza*, *B. peregrina* e *B. tenagophila guaibensis*, sendo sete populações de *B. tenagophila guaibensis*, cinco populações de *B. peregrina*, três populações de *B. oligoza* (tabela 4) (Figura 8).

Em dois municípios, Dom Pedrito e Santa Vitória do Palmar, foram examinados populações de três e duas diferentes localidades, respectivamente. No município de Dom Pedrito foram identificadas duas espécies (*B. peregrina* e *B. tenagophila guaibensis*) e em Santa Vitória do Palmar nas duas localidades foi identificada a mesma espécie (*B. tenagophila guaibensis*).

As características morfológicas observadas nas diferentes populações de *B. oligoza* são: concha com 7 a 9 mm de diâmetro, 5 giros, lado esquerdo com giro central variando de medianamente a profundo, suturas evidentes e ausência de carena; lado direito com giro central bastante profundo, suturas menos marcadas que o lado esquerdo e ausência de carena. Em relação à morfologia interna não foi observada a presença de crista ou pigmento na parede do tubo renal, presença de bolsa vaginal pequena ou discreta, reduzido número de divertículos prostáticos, variando de dois a cinco; prepúcio variando de um pouco mais longo ou igual a bainha do pênis; bainha do pênis um pouco mais delgada que o prepúcio e canal deferente fino. A característica diferencial em relação às outras espécies foi o pequeno número de divertículos prostáticos.

Tabela 4 – Espécies de *Biomphalaria* amostradas em municípios do Rio Grande do Sul, identificadas em laboratório e procedência

Município	Localidade	Espécie
Arroio Grande	Barragem Chasqueiro	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Bagé	EMBRAPA-CPPSul	<i>B. peregrina</i>
Camaquã	Pacheca	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Canguçu	Cabanha Cafundó	<i>B. oligoza</i>
Capão do Leão	Fazenda Bela Vista	<i>B. oligoza</i>
Dom Pedrito	Passinho do amor	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Dom Pedrito	Chácara do Cedro	<i>B. peregrina</i>
Dom Pedrito	Estrada do Meio	<i>B. peregrina</i>
Jaguarão	Granja Bretanha	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Pelotas	Barragem SANEP	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Rio Grande	Rio Grande	<i>B. peregrina</i>
Rosário do Sul	Estância St ^a	<i>B. peregrina</i>
	Ambrosina	
Santa Vitória do Palmar	Estância Ipiranga	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
Santa Vitória do Palmar	Granja Figueira	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
São Gabriel	FEPAGRO-Forageiras	<i>B. oligoza</i>

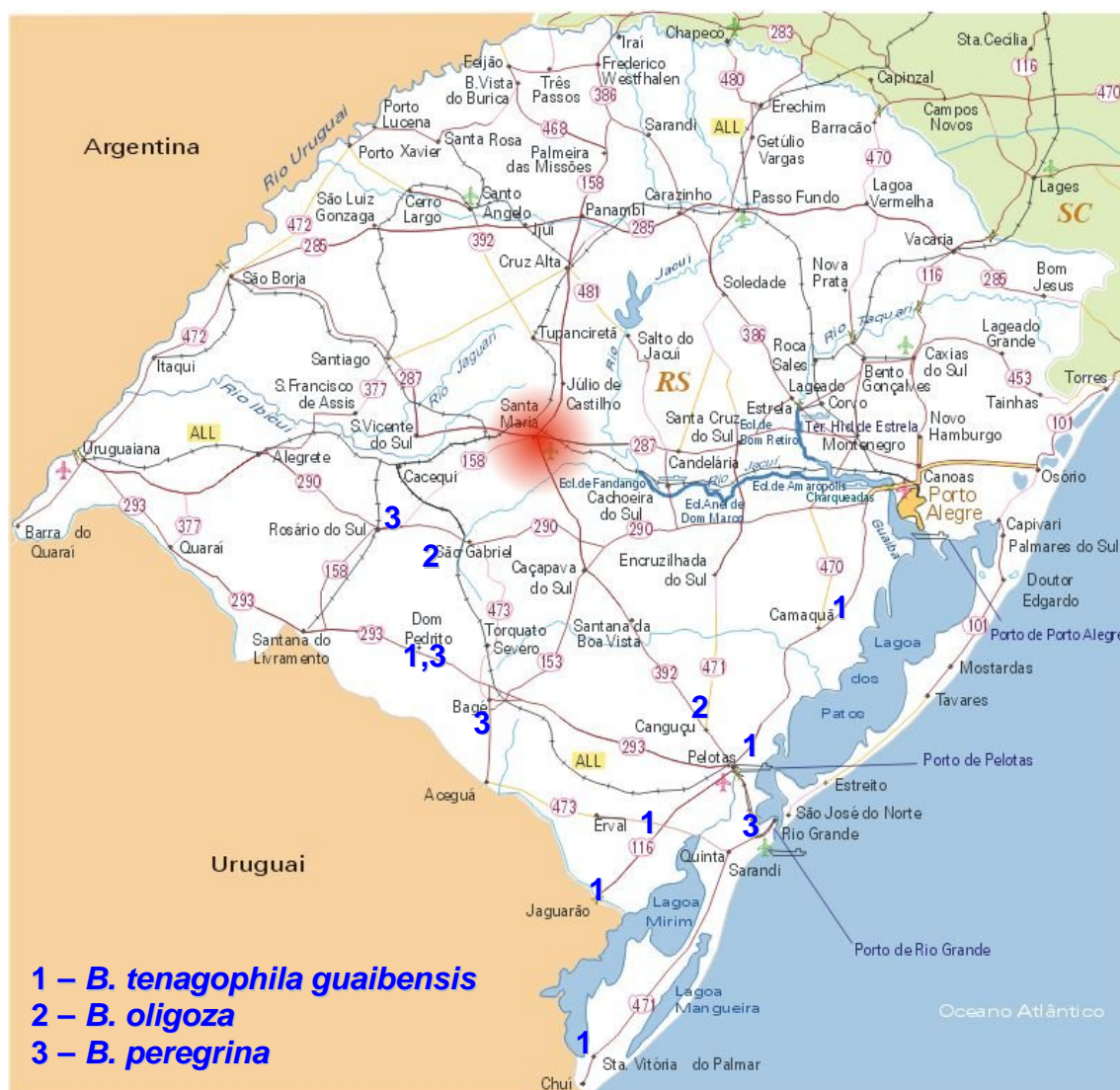


Figura 8 – Distribuição das espécies de *Biomphalaria* encontradas nos diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Brasil

Já para as populações de *B. peregrina* foi observado concha variando de 6 a 12 mm de diâmetro, 4 a 6 giros, lado esquerdo com giro central profundo, suturas evidentes a profundas, carena ausente, discreta ou evidente, último giro pode ser maior que os demais; no lado direito foi observado giro central variando de profundo a raso, suturas menos evidentes que o lado esquerdo e carena ausente, presente ou discreta. Anatomia interna: ausência de pigmento e crista na parede do tubo renal, presença de bolsa vaginal, podendo ser bem evidente, grande número de divertículos prostáticos, espermateca pode ser bem desenvolvida, últimos divertículos prostáticos encobrem a porção final da espermateca, prepúcio variando de um pouco maior ou menor ou de tamanha

similar a bainha do pênis, prepúcio variando de um pouco mais larga a mais largo que a bainha do pênis, canal deferente fino. A característica mais representativa são os últimos divertículos prostáticos que encobrem a porção final da espermateca.

Nas populações de *B. tenagophila guaibensis* observou-se conchas com diâmetro de 11 a 21 mm e com 5 a 7 giros; lado esquerdo com giro central medianamente a profundo, giros crescem de acordo com enrolamento ou último giro maior que os demais, suturas marcadas e presença de carena; já o lado direito apresenta giro central mais profundo, suturas menos marcadas que o lado esquerdo ou rasas, carena. A anatomia interna apresenta manto sem crista e com ausente, discreto ou presente pigmento na parede do tubo renal; parede vaginal expandida em bolsa, muito divertículos prostáticos, espermateca podendo ser bem desenvolvida; prepúcio longo a muito longo e fino, prepúcio maior a duas vezes maior que a bainha do pênis, bainha do pênis com diâmetro menor ou similar ao prepúcio, canal deferente muito longo e fino. As características de maior importância estão relacionadas às variações de espessura e comprimento do prepúcio, bainha do pênis e canal deferente.

5.2. Identificação molecular

A Fig. 9 mostra os produtos de amplificação de DNA através de PCR específico de três moluscos da população de Canguçu, Bagé (EMBRAPA-CPPSul), São Gabriel (FEPAGRO-Forrageiras), dois moluscos da população de Capão do Leão (Fazenda Bela Vista) e um molusco de Pelotas (Barragem SANEP), indicando banda única de aproximadamente 900 pares de bases, sendo esse perfil característico do gênero *Biomphalaria*.

Os perfis de bandas visualizados, após eletroforese, em gel de poliacrilamida a 6%, obtidos a partir do PCR-RFLP ratificaram os resultados obtidos na identificação morfológica dos moluscos *Biomphalaria* em diferentes localidades do RS.

Os moluscos *B. oligoza* de Canguçu, Capão do Leão (Fazenda Bela Vista) e São Gabriel (FEPAGRO-Forrageiras) apresentaram o perfil molecular com quatro bandas distintas com peso molecular de aproximadamente 420, 350, 175, 130 pb, respectivamente.

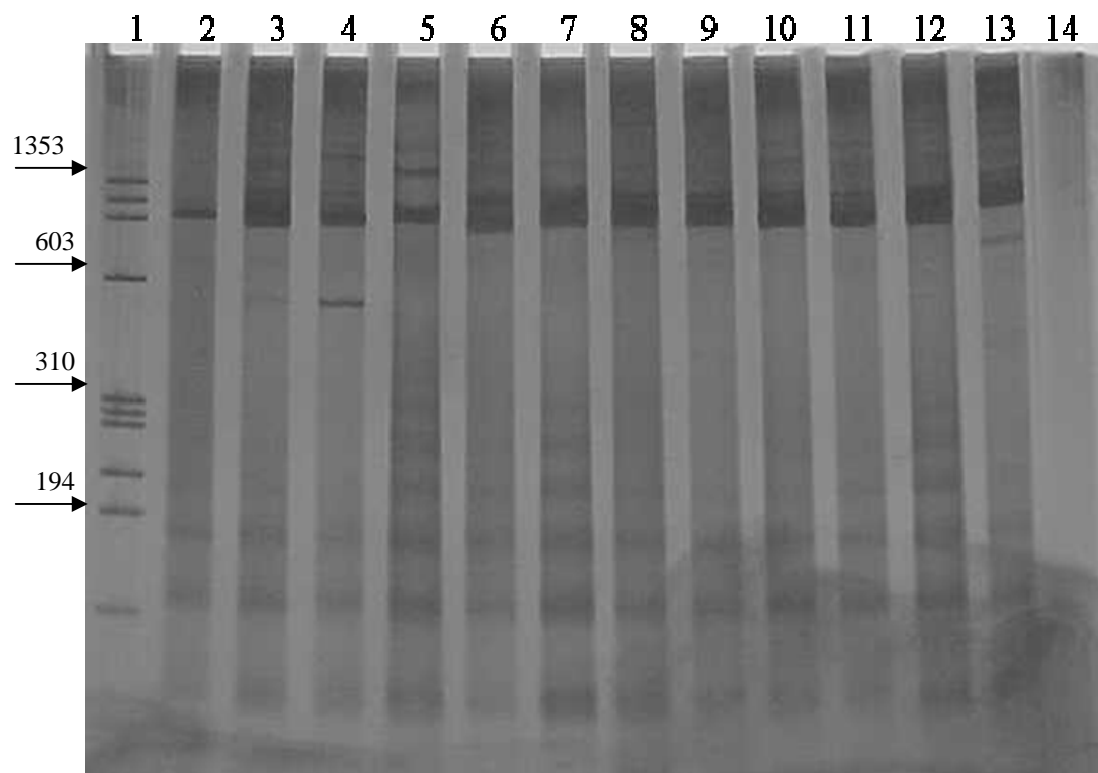


Figura 9– Perfil de PCR específico do produto amplificado da região ITS do rDNA de *Biomphalaria* em gel de poliacrilamida 6%, corado com prata. Canaleta: 1 – Padrão de peso molecular Phi X 174; 2 a 4 – Canguçu; 5 a 7 - Bagé (EMBRAPA-CPPSul); 8 e 9 - Capão do Leão (Fazenda Bela Vista); 10 a 12 - São Gabriel (FEPAGRO-Forageiras), 13 – Pelotas (Barragem SANEP) e 14 – Controle negativo

Já as populações de *B. tenagophila guaibensis* de Pelotas (Barragem SANEP), Arroio Grande (Barragem Chasqueiro), Santa Vitória do Palmar (Granja Figueira), Dom Pedrito (Passinho do Amor), Camaquã (Pacheca), Santa Vitória do Palmar (Estância Ipiranga), Jaguarão (Granja Bretanha) e Alegrete apresentaram três bandas de 440, 230 e 130 pb, respectivamente.

As populações de *B. peregrina* de Bagé (EMBRAPA-CPPSul), Rio Grande, Dom Pedrito (Chácara do Cedro e Estrada do Meio respectivamente), Rosário do Sul (Santa Ambrosina) apresentam perfil com quatro diferentes bandas com peso molecular de 380, 310, 175 e 130 pb respectivamente.

Esses perfis são observados na Fig. 10.

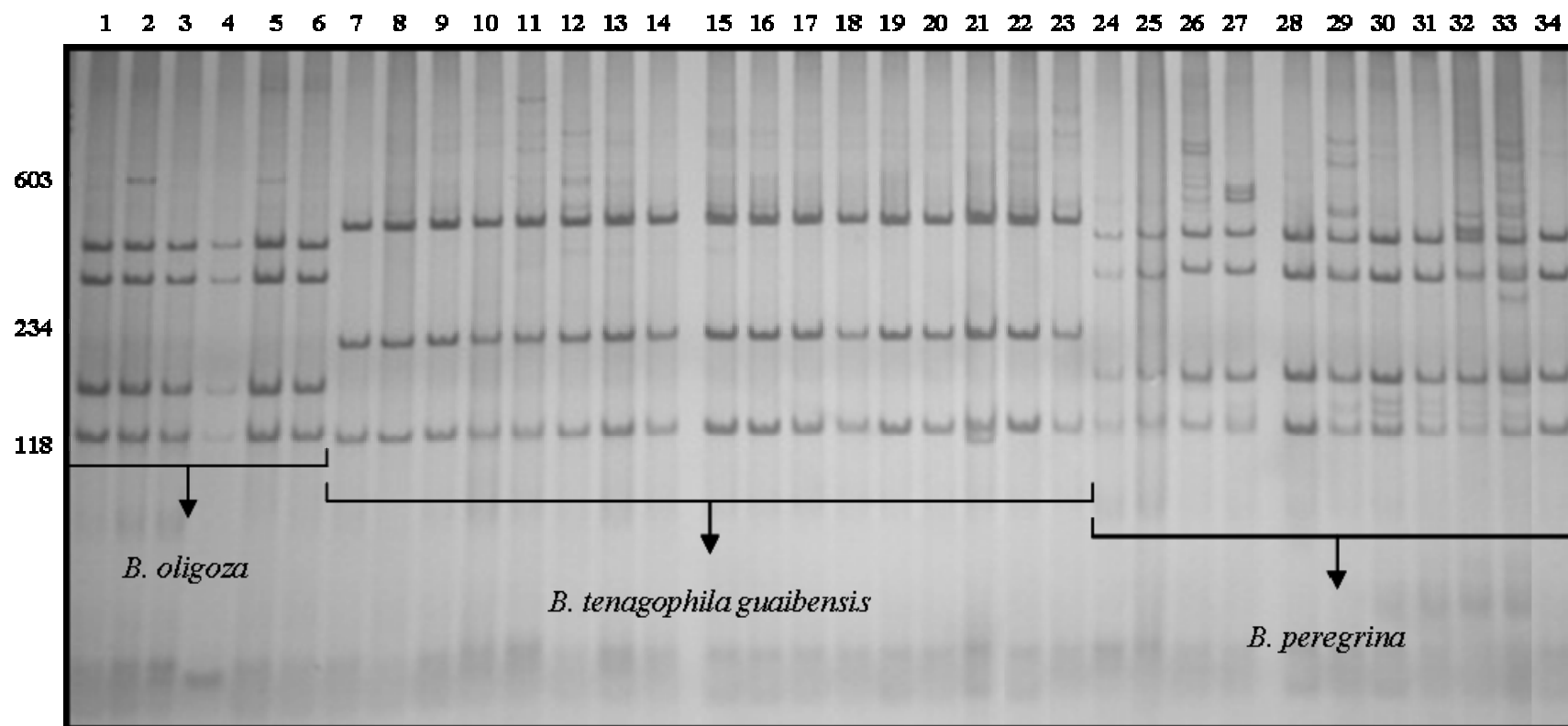


Figura 10 – Perfis de PCR-RFLP obtidos da digestão do produto amplificado da região ITS do DNAr utilizando a enzima *DdeI* das diferentes populações de *Biomphalaria* em gel de poliacrilamida 6% corado com prata Canaletas: **1** – Controle Positivo de *Biomphalaria oligoza* ; **2e 3** – Canguçu; **4 e 5** – Capão do Leão (Fazenda Bela Vista); **6** – São Gabriel (FEPAGRO-Forrageiras); **7** – Controle positivo de *Biomphalaria tenagophila guaibensis*; **8 e 9** – Pelotas (Barragem SANEP); **10 e 11** – Arroio Grande (Barragem Chasqueiro); **12 e 13** – Santa Vitória do Palmar (Granja Figueira); **14 e 15** – Dom Pedrito (Passinho do Amor); **16 e 17** – Camaquã (Pacheca); **18 e 19** – Santa Vitória do Palmar (Estância Ipiranga); **20 e 21** – Jaguarão (Granja Bretanha); **22e 23** – Alegrete; **24** – Controle positivo de *Biomphalaria peregrina*; **25 e 26** – Bagé (EMBRAPA-CPPSul); **27 e 28** – Rio Grande; **29-30** – Dom Pedrito (Chácara do Cedro); **31 e 32** – Dom Pedrito (Estrada do Meio); **33 e 34** – Rosário do Sul (Santa Ambrosina).

5.3 Habitats onde foram encontrados os moluscos

As coletas de moluscos foram realizadas principalmente em açudes, canais de irrigação e canais secundários de irrigação. Foram coletados em açudes nos municípios de Bagé (EMBRAPA-CPPSul), Canguçu, Capão do Leão (Fazenda Bela Vista), Dom Pedrito (Chácara do Cedro), Rosário do Sul (Estância Santa Ambrosina), São Gabriel (FEPAGRO-Forrageiras). Em relação a canais de irrigação foi observado moluscos em Jaguarão (Granja Bretanha), Rio Grande, Santa Vitória do Palmar (Estância Ipiranga e Granja Figueira). Nos municípios de Camaquã (Pacheca), Dom Pedrito (Passinho do Amor e Estrada do Meio) e Jaguarão (Granja Bretanha) foram coletados caramujos em canais secundários das plantações de arroz. No município de Arroio Grande (Barragem Chasqueiro) os moluscos foram encontrados em córregos e pequenas coleção d'água, já no município de Pelotas forma encontrados em um pequeno tanque com peixes na Barragem SANEP. Alguns destes locais podem ser observados na Figura 11. Das três espécies identificadas, somente *B. oligoza* foi coletada no mesmo habitat, sendo em açudes de propriedades rurais. A relação entre os habitats e as espécies de *Biomphalaria* encontradas está representada na tab. 5.

5.4 Geração F1 obtida em laboratório

Todas as populações de diferentes espécies de *Biomphalaria* provenientes das coletas foram mantidas de forma individual e em mesma condição de criação, com troca periódica de água e alimentação.

Dentre as populações de *B. tenagophila guaibensis* somente as populações de Pelotas (Barragem SANEP), Camaquã (Pacheca), Arroio Grande (Barragem Chasqueiro) e Dom Pedrito (Passinho do Amor) se reproduziram em condições de laboratório e realizaram postura. Entretanto o número de moluscos obtido foi pequeno e estes não se desenvolveram para que pudessem ser utilizados nos demais experimento deste estudo.



Figura 11 – Diferentes habitats de diversos municípios do Rio Grande do Sul onde foram encontrados moluscos do gênero *Biomphalaria*. A- córrego na Barragem Chasqueiro (Arroio Grande); B – açude da EMBRAPA-CPPSul (Bagé); C – canais secundários de irrigação em Pacheca (Camaquã); D – canais de irrigação na Granja Bretanha (Jaguarão); E – açude na FEPAGRO (São Gabriel); F – canais de irrigação Estância Ipiranga (Santa Vitória do Palmar).

Tabela 5 – Procedência, espécie e habitats onde foram encontradas as populações de *Biomphalaria* na região sul do Rio Grande do Sul

Procedência	Espécie	Habitat
Arroio Grande (Barragem Chasqueiro)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Corrégos e pequena coleção de água
Bagé (EMBRAPA-CPPSul)	<i>B. peregrina</i>	Açude
Camaquã (Pacheca)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Canais secundários de irrigação
Canguçu (Cabanha Cafundó)	<i>B. oligoza</i>	Açude
Capão do Leão (Fazenda Bela Vista)	<i>B. oligoza</i>	Açude
Dom Pedrito (Passinho do amor)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Canais secundários de irrigação
Dom Pedrito (Chácara do Cedro)	<i>B. peregrina</i>	Açude
Dom Pedrito (Estrada do Meio)	<i>B. peregrina</i>	Canais secundários de irrigação
Jaguarão (Granja Bretanha)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Canais de irrigação principais e secundários
Pelotas (Barragem SANEP)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Tanque de peixes
Rio Grande (Rio Grande)	<i>B. peregrina</i>	Canais de irrigação
Rosário do Sul (Estância St ^a Ambrosina)	<i>B. peregrina</i>	Açude
Santa Vitória do Palmar (Estância Ipiranga)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Canais de irrigação
Santa Vitória do Palmar (Granja Figueira)	<i>B. tenagophila guaibensis</i>	Canais de irrigação
São Gabriel (FEPAGROForrageiras)	<i>B. oligoza</i>	Açude

As populações de *B. peregrina* que se reproduziram em laboratório são provenientes de Rosário do Sul (Santa Ambrosina), Dom Pedrito (Estrada do Meio e Chácara do Cedro), Bagé (EMBRAPA-CPPSul), Rio Grande. Contudo apenas duas populações atingiram o número de exemplares (mínimo de 50) e o tamanho (4 a 6mm de diâmetro) necessário para ser realizada a infecção por *S. mansoni*, sendo estas as populações de Dom Pedrito (Estrada do Meio) e Rio Grande.

As três populações de *B. oligoza* não se reproduziram em condições de laboratório.

5.5. Avaliação da suscetibilidade de *Biomphalaria peregrina* ao *S. mansoni*.

Nos exames de exposição à luz e esmagamento, realizado nas duas populações de *B. peregrina*, não foi verificada a presença de cercárias ou esporocistos de *S. mansoni* em nenhum exemplar expostos aos miracídios. A taxa de mortalidade dos moluscos variou de 0 a 16%, conforme tab. 6.

Tabela 6 – Resistência de duas populações de *Biomphalaria peregrina*, RS, e uma população de *B. glabrata* (controle), MG, à infecção com a cepa LE de *S. mansoni*.

Número de moluscos	Espécie de molusco	Procedência da população	Numero de miracídios/molusco	% de infecção	% de mortalidade
50	<i>B. peregrina</i>	Dom Pedrito	100	0	4
50	<i>B. peregrina</i>	Rio Grande	100	0	0
50	<i>B. glabrata</i>	Barreiro de Cima (MG)	20	52	16

6. Discussão

A ampla distribuição geográfica e a importância médica dos moluscos do gênero *Biomphalaria* vêm despertando a atenção de pesquisadores e têm sido alvo de inúmeros estudos, tanto no que se refere a determinação das espécies presentes nas diferentes regiões do Brasil, bem como verificação da possibilidade de ser um molusco suscetível ao *Schistosoma mansoni*.

As espécies identificadas no presente estudo encontravam-se em uma ampla variação de habitats, isto também foi observado por Paraense (1972) quando salientou que as espécies de *Biomphalaria* ocupam áreas geográficas muito vastas, portanto adaptadas a grande variedade e a considerável amplitude de condições ambientais.

Não foi observada a ocorrência da mesma espécie em todos os habitats estudados, sendo *B. tenagophila guaibensis* a espécie que apresentou a maior variabilidade de habitats (canais de irrigação, canais secundários de irrigação, córregos, pequenas coleções d'água e tanques de peixes). Na região de Guaíba, Paraense (1984) registra a ocorrência de *B. tenagophila guaibensis* apenas em valas de drenagem. Quando foi analisado o número de populações de diferentes espécies observou-se que *B. tenagophila guaibensis* apresentou o maior número de populações, tendo ocorrido em seis localidades de cinco diferentes municípios (Arroio Grande, Camaquã, Dom Pedrito, Jaguarão, Pelotas e Santa Vitória do Palmar). Resultado semelhante foi observado por Paraense (1984) em relação aos municípios de Arroio Grande, Jaguarão, Pelotas. Já no levantamento realizado por Teles et al. (1991) não houve registro de nenhuma população de *B. tenagophila guaibensis* no Rio Grande do Sul. Com isso, nesse estudo *B. tenagophila guaibensis* foi relatada pela primeira vez para os municípios de Camaquã, Dom Pedrito e Santa Vitória do Palmar.

Diferentemente de *B. tenagophila guaibensis*, *B. oligoza* foi relatada em apenas um tipo de habitat, sendo coletada em açudes dos municípios de Canguçu, Capão do Leão e São Gabriel. A ocorrência dessa espécie é o primeiro relato em relação aos municípios acima citados. Devido as inevitáveis adaptações das populações aos ambientes locais, nem sempre é possível generalizar os resultados dos estudos a totalidade das populações de uma espécie (Paraense, 1972). Dessa forma, embora tenha sido observada nesse estudo a presença de *B. oligoza* em um único tipo de criadouro, não se pode limitar a ocorrência dessa espécie a este habitat específico.

As populações de *B. peregrina* encontradas já haviam sido relatadas em outros levantamentos malacológicos (Paraense, 1966; Fróes & Lima, 1975). Essas populações foram coletadas em açudes, canais de irrigação e canais secundários de irrigações de plantações de arroz. Fróes e Lima (1975) também relatam à presença de *B. peregrina* em canais de irrigação, como também em coleções de água parada com a presença de gramíneas, habitats semelhantes aos açudes de Bagé (EMBRAPA-CPPSul), Dom Pedrito (Chácara do Cedro), Rosário do Sul (Estância Santa Ambrosina) em que foram encontrados moluscos *B. peregrina*. Semelhante habitat foi observado por Paraense (1966) com presença de *B. peregrina* em uma vala de drenagem no município de San Jose de Maipo (Chile). Outro resultado similar foi relatado por Paraense (1985) demonstrando a ocorrência de *B. peregrina* nos municípios de Dourados (MS) e Cuiabá (MT) em valas de drenagem de fazendas de frangos; verificou também *B. peregrina* em mananciais naturais com pastagem, ambiente em que não foi observada essa espécie. Paraense (1966) também relata a ocorrência de *B. peregrina* em ambientes naturais como lagoas, brejos, pântanos, riachos e arroios em Maldonado (Uruguai), lagoa rasa próxima ao rio Maipo com presença de algas Chlorophyta e pequenas lagoas em San Jose de Maipo (Chile), bacias de drenagem do rio Salado (Argentina) e pântanos e suas margens no Equador. Esse resultado é contrário ao observado nas populações estudadas, uma vez que *B. peregrina* foi apenas relatada em habitats modificados pelo homem.

Dentre as populações estudadas, 87% (13/15) foram coletadas em ambientes modificados ou criados pelo homem, como açudes, canais de irrigação e plantações de arroz, demonstrando a capacidade adaptativa dessas

populações às alterações antrópicas, bem como a possibilidade de adequação de espécies ainda não relatadas para o Estado ou espécies vetoras da esquistossomose. Isto também foi observado por Coimbra Jr. & Santos (1986) observaram que os criadouros em que foi encontrado maior número de *Biomphalaria* spp. foram aqueles profundamente alterados pelo homem, reforçando a hipótese da estreita associação homem/caramujo, além da relação entre a quantidade de matéria orgânica no meio e a densidade de caramujos.

As coletas dos moluscos em propriedades com plantio irrigado foram realizadas em período pós-colheita, com menor quantidade de água nos canais de irrigação; mesmo assim foram encontradas diferentes espécies de *Biomphalaria* nestes habitats, o que não foi observado por Kloos et al. (2001), quando realizaram coletas de moluscos em canais pós-colheita em Minas Gerais. Provavelmente essa diferença esteja relacionada às diferentes condições climáticas da região estudada.

A população de *B. tenagophila guaibensis* de Arroio Grande (Chasqueiro) foi encontrada, em uma pequena coleção d'água e córregos provenientes do extravasamento da água excedente dos tanques de piscicultura. Com isso é possível supor que esses moluscos sejam provenientes dos tanques de piscicultura, sendo disseminados pelo extravasamento quando ocorre cheia dos tanques. Além disso, também se pode atribuir à ocorrência de espécies trazidas por peixes de outras localidades, já que o processo de quarentena não é realizado. Mesmo se tratando de uma subespécie não suscetível ao *S. mansoni*, pode-se inferir que ocorre a propagação de moluscos através da estação de piscicultura, sendo necessária a vigilância quando se trata da importação de peixes provenientes de zonas endêmicas da esquistossomose, sendo possível a instalação de novas espécies de *Biomphalaria* trazidas pelos peixes ou a água onde estes são transportados. Além disso, devemos considerar as possíveis perdas econômicas, pois quando são encontrados esses moluscos vetores é necessário o tratamento dos tanques, que pode levar a mortalidade total de peixes.

A correta identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* é importante para a melhoria dos trabalhos de vigilância epidemiológica da

esquistossomose, uma vez que permite detectar, com exatidão, as espécies presentes em áreas de transmissão, bem como em áreas endêmicas, que na presença de determinadas espécies suscetíveis ou potencialmente suscetíveis ao *S. mansoni*, podem vir a se tornar foco da doença. Desde os primeiros trabalhos baseados na morfologia da concha, seguidos de estudos sobre a anatomia interna dos planorbídeos, os pesquisadores procuram definir os melhores caracteres para um diagnóstico preciso e confiável (Paraense, 1956, 1972, 1975).

Em alguns exemplares de *B. tenagophila guaibensis* observados no presente estudo, podendo ser espécimes de uma mesma população ou em diferentes populações, foi observada uma pigmentação na parede do tubo renal, sendo essa característica não relatada por Paraense (1984). Dentre as espécies conhecidas no Brasil, a única espécie que apresenta tubo renal pigmentado, e também crista, é *Biomphalaria glabrata*, a principal espécie transmissora do *S. mansoni* no Brasil (Paraense, 1975). Segundo Paraense (1972) o caráter definidor da *B. glabrata* é a crista pigmentada que se estende ao longo da superfície ventral do tubo renal, além de ser a principal característica para a diferenciação de *B. tenagophila*. A presença desta pigmentação no tubo renal de *B. tenagophila guaibensis* pode ser atribuída à variação intra-específica da espécie, bem como a variação de coloração relacionada ao contato com as substâncias corantes dissolvidas nas águas dos criadouros (Paraense, 1972). Mas isso não atenua a possibilidade de diagnóstico equivocado dessa espécie, bem como ações sanitárias desnecessárias no combate a um possível foco de espécie hospedeira da esquistossomose, pois essa subespécie é sabidamente refratária ao *S. mansoni* (Paraense & Correa, 1987).

As populações de *B. peregrina* estudadas apresentaram características específicas que concordam com as relatadas na descrição da espécie realizado por Paraense (1966). De forma semelhante, as diferentes populações de *B. oligoza* apresentaram caracteres similares aos descritos por Paraense (1974).

No presente estudo foi possível observar que a identificação molecular corrobora com os resultados obtidos através da análise morfológica, sendo ferramenta essencial em caso de características duvidosas, como a presença

de pigmento no tubo renal de alguns exemplares *B. tenagophila guaibensis*. Resultados semelhantes foram observados por vários autores (Caldeira, 1998a e 1999; Spatz, 1999 e 2000; Vidigal, 1998 e 2000a), demonstrando que esses dois métodos diagnósticos são completamente compatíveis, sendo aconselhável a utilização do método tradicional como rotina e análise molecular para casos inconclusivos, visto o alto custo desta técnica.

A determinação exata da espécie tem grande importância epidemiológica, pois a identificação equivocada de *B. tenagophila guaibensis* como sendo *B. glabrata*, uma vez que essas espécies foram relatadas compartilhando o mesmo habitat no Estado sem competição entre si (Carvalho et al., 1998), indicaria uma falsa população de moluscos possivelmente transmissores de *S. mansoni*, o que pode promover ações sanitárias desnecessárias, sendo esse processo oneroso e sem relevância no que se refere ao controle da esquistossomose.

O perfil molecular das populações de *B. oligoza* de Canguçu, Capão do Leão e São Gabriel corrobora com os resultados observados por Vidigal et al. (2000b).

Considerando-se a variabilidade genética existente nas amostras do *S. mansoni*, o nível de suscetibilidade ou resistência dentro de uma população de *B. glabrata* é definida pela proporção de moluscos cujos genótipos permitem ou não o desenvolvimento do parasita (Theron et al., 1997).

A obtenção de populações altamente suscetíveis é possível através da seleção de gerações utilizando a autofecundação de moluscos suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, sendo possível, após a quarta geração, obterem-se taxas de quase 100% de infecção (Zuim et al., 2005).

O primeiro caso autóctone de esquistossomose no Rio Grande do Sul foi registrado no município de São Valentim, em uma menina de nove anos nascida no Rio Grande do Sul e com pais naturais de zona endêmica desta parasitose (Louzada, 1973). Em um levantamento planorbídico realizado por Fróes e Lima (1975) a única espécie encontrada foi *B. peregrina*, não tendo sido realizado qualquer teste de suscetibilidade com essa população. Carvalho et al. (1998) destaca a necessidade de estudos mais detalhados sobre esse achado. Teixeira et al. (1999 e 2004) não consideram esse relato como o primeiro caso autóctone, embora seja muito questionada a veracidade desses

resultados, não se pode descartar a hipótese da suscetibilidade da população de *B. peregrina*, procedente de São Valentim, ao *S. mansoni*, podendo ser essa a responsável pela transmissão da esquistossomose nesse caso específico.

Nas populações de *B. peregrina* testadas para suscetibilidade nesse estudo (Dom Pedrito e Rio Grande), não foi constatada a presença de cercárias ou esporocistos de *S. mansoni*, embora não tenha sido realizada a investigação em todas as populações encontradas na região Sul do Rio Grande do Sul, devido à ineficiente fertilidade desses moluscos em condições de laboratório. Isso ressalta a necessidade de estudos mais detalhados sobre a suscetibilidade de diferentes populações de *B. peregrina* no Estado e seu possível papel na transmissão da esquistossomose nessa região não endêmica. Resultado semelhante foi observado por Souza et al. (1989), que testaram uma população de Santa Rita do Sapucaí (MG) com três cepas diferentes de *S. mansoni* (Belo Horizonte, São José dos Campos, Alagoas), sendo essa resistente à infecção a qualquer destas cepas. Paraense (1973) também observou a resistência da população de *B. peregrina* de Pouso Alegre, sendo essa região vizinha a Santa Rita do Sapucaí (MG). Entretanto populações de *B. peregrina* de Lapa (PR) e também procedentes do Equador mostraram-se suscetíveis experimentalmente à infecção por *S. mansoni*, podendo ser consideradas hospedeiras em potencial de *S. mansoni* nas regiões de origem (Paraense, 1973).

Essa variação de suscetibilidade demonstra as possíveis diferenças entre as populações de *B. peregrina*, o que reafirma a necessidade de verificação da suscetibilidade de maior número de populações desta espécie de molusco do Rio Grande do Sul, visto a possibilidade de ser potencialmente um vetor da esquistossomose no Estado.

A taxa de mortalidade das duas populações em que foi avaliada a suscetibilidade variou de 0 a 4,17%, resultado diferente do observado por Souza et al. (1988) que variou de 0 a 20%, sendo que três das seis amostras estudadas apresentaram índice superior a 12%. Para populações de *B. glabrata*, utilizada como controle da infecção, foi observada a mesma disparidade, sendo observado nesse estudo 16% de mortalidade e variação de 16 a 28%. Esses autores também demonstram que o número de miracídios e

as diferentes cepas (provenientes de três regiões distintas) utilizados para infecção dos moluscos não interfere no índice de mortalidade.

Como no Rio Grande do Sul a ocorrência de *B. peregrina* é observada em vários municípios (Paraense, 1966) é necessário maior número de experimentos com populações de diferentes regiões para verificar a importância epidemiológica dessa espécie.

Embora seja reconhecido que o caminho mais adequado seja o do saneamento básico associado ao tratamento específico para o controle da esquistossomose, sabe-se das dificuldades política e econômica do momento, que impedem ou dificultam o uso destas medidas nos países subdesenvolvidos, e assim sendo, formas alternativas devem ser desenvolvidas para combater a permanência e/ou expansão dessa enfermidade no Brasil (Katz, 1999).

Como os trematódeos apresentam alta especificidade quanto ao hospedeiro intermediário e para seu controle é indispensável a identificação precisa dos moluscos vetores, o dimensionamento das áreas colonizadas por essas espécies é bastante útil ao controle e vigilância epidemiológica, na medida em que permite o planejamento adequado das diversas atividades previstas nos programas de controle da esquistossomose. Com isso destaca-se a importância de levantamentos malacológicos que visem o conhecimento das diferentes espécies de *Biomphalaria*, a diversidade de habitats em que estes são encontrados, bem como o estudo da suscetibilidade de espécies vetoras ou potencialmente vetoras de *S. mansoni*, podendo assim estipular estratégias para a vigilância epidemiológica da esquistossomose no Rio Grande do Sul.

7. Conclusões

- É confirmada a ocorrência de *Biomphalaria oligoza*, *B. peregrina* e *B. tenagophila guaibensis*, na região sul do Rio Grande do Sul.
- *Biomphalaria oligoza* é o primeiro registro para os municípios de Canguçu, Capão do Leão e São Gabriel;
- *Biomphalaria tenagophila guaibensis* é o primeiro registro para os municípios de Camaquã, Dom Pedrito e Santa Vitória do Palmar;
- Há concordância entre os resultados obtidos através da identificação morfológica e molecular das espécies de *Biomphalaria*;
- PCR-RFLP é uma técnica complementar confirmatória para identificação de espécies de *Biomphalaria*;
- É possível obter em laboratório a geração F1 a partir de populações de *B. peregrina* e *B. tenagophila guaibensis* de campo;
- As duas populações de *B. peregrina*, infectadas experimentalmente em laboratório, são resistentes à infecção de *Schistosoma mansoni* (cepa LE).

Referências

ABDEL-HAMID, A.H.Z.; MOLFETTA, J.B.; FERNANDEZ, V.; RODRIGUES, V. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma mansoni* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.41, n.5, p. 291-295, 1999.

AMARAL, R.S. & PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.27, supl. III, p.73-90, 1994.

BARGUES, M.D.; VIGO, M.; HORAK, P.; DVORAK, J.; PATZNER, R.A.; POINTIER, J.P.; JACKIEWICZ, M.; MEIER-BROOK, C.; AND MAS-COMA, S. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 85-107, 2001

BASTOS, O.C.; SCHIAVOTELO, R.J.G.; RIBEIRO, M.L.J.F. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* do estado de São Paulo a infecção por linhagens de *Schistosoma mansoni* da Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v.18, p. 355-358, 1984.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, supl. I, p. 219-225, 1998.

CALDEIRA, R.L. **Identificação molecular e análise da variabilidade genética dos moluscos do complexo *Biomphalaria straminea* pelas técnicas de PCR-RFLP e SSR-PCR**. 1999. 0 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz, Minas Gerais.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.4, p. 535-544, 2001.

CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O.S.; LAGE, R.C.G. Sequencing of simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification products of *Biomphalaria glabrata*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, supl.1, p.23-26, 2002.

CAMPOS, Y.R. **Comparação das técnicas SSR-PCR ancorado, AP-PCR e Isoenzimas no estudo da variabilidade genética de *Biomphalaria glabrata***. 2001. 85 f. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CAMPOS, Y.R.; CARVALHO, O.S.; GOVEIA, C.O.; ROMANHA, A.J. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR-PCR **Acta Tropica** v.83, p. 19-27, 2002.

CARDOSO, P.C.M.; CALDEIRA, R.L.; LOVATO, M.B.; COELHO, P.M.Z.; BERNE, M.E.A.; MULLER, G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), na intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). **Acta Tropica** v. 97, p. 339-345, 2006.

CARVALHO, O.S.; ROCHA, R.S.; MASSARA,, C.L.; KATZ, N. Expansão da esquistossomose mansoni em Minas Gerais. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, n. 4, p. 295-298, 1987.

CARVALHO, O.S.; NUNES, I.M.; CALDEIRA, R.L. First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n.1, p. 39-40, 1998.

COIMBRA JR., C.E.A. & SANTOS, R.V. Moluscos aquáticos do Estado de Rondônia (Brasil), com especial referencia ao gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Pulmonata, Planorbidae) **Revista Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 227-234, 1986.

CORREA, R.R.; MURGEL, J.M.T.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; DIAS, L.C.S.; MORAIS, L.V.; ROSÁRIO, F.F. Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes. **Revista Saúde Pública**, v.4, p. 117-127, 1970.

CORRÊA L.R., PARAENSE W.L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v.13, p. 387-390, 1971.

CUNHA NETO, A.G. *Biomphalaria straminea* em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Atas Sociedade Biologia**, v. 15, p. 157, 1972

DIKKEBOOM, R.; KNAAP, W.P.W.; MEULEMAN, E.A.; SMINIA, T. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. **Immunology**, v. 55, p. 547-553, 1985.

ENK, M.J.; CALDEIRA. R.L.; CARVALHO, O.S.; SCHALL, V.T. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 105-108, 2004.

FERNANDEZ, M.A. *Schistosoma mansoni* infections in the first three months of life of sympatric intermediate hosts from Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p. 27-29, 1997.

FERNANDEZ M.A. & PIERI, O.S. Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the First Four Months of Life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 185-192, 2001.

FERNANDEZ, M.A.; THIENGO, S.C.; BOAVENTURA, M.F. Gastrópodes límnicos do Campus de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 279-282, 2001.

FRÓES, O.M. & LIMA, D.F. Contribuição ao estudo da biogeografia, sistemática e ecologia dos Planorbídeos (Gastropoda: Planorbidae) do Rio Grande do Sul **Iheringia Zoologia**, v. 47, p. 67-72, 1975.

GAZIN, P.; BARBOSA, C.S.; BOUVY, M.; AUDRY, P. Registro de ocorrência de vetores da esquistossomose mansônica em açude do Sertão de Pernambuco **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 407-408, 2000.

HOFMAN, P.R.P. Aspectos da Biologia e do Polimorfismo Enzimático em Três Espécies do Gênero *Biomphalaria*, Thesis, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 117 pp. 1987 Apud CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular Identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, supl. I, p. 219-225, 1998.

HOFFMAN, J.I.; WEBSTER, J.P.; NDAMBA, J.; WOOLHOUSE, M.E. Extensive genetic variation revealed in adjacent populations of the schistosome intermediate host *Biomphalaria pfeifferi* from single river system. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v.92, p. 693-698, 1998.

JANNOTTI-PASSOS, L.K.; SOUZA, C.P. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 5, p. 291-294, 2000.

JONES, C.S.; LOCKYER, A.E.; ROLLINSON, D.; PIERTNEY, S.B.; NOBLE, L.R. Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2149-2151, 1999.

KANE, R.A. & ROLLINSON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. **Molecular Biology Parasitology**, v. 63, p. 153-156.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n. 6, p. 705-711, 1999.

KATZ, N. & PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p.303-308, 2000.

KLOOS, H.; SOUZA,C.; GAZZINELLI, A.; FILHO, B.S.S.; TEMBA, P.C.; BETHONY, J.; PAGE, K.; GRZYWACZ, C.; LEWIS, F.; MINCHELLA, D.; LOVERDE, P.; OLIVEIRA, R.C. The distribution of *Biomphalaria* spp.. in different habitats in relation to physical, biological, water contact and cognitive factors in a rural area in Minas Gerais, Brazil **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p. 57-66, 2001.

KLOSS, H.; PASSOS, L.K.J.; LOVERDE, P.; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.7, p. 673-681, 2004.

KNIGHT, M.; ONGELE, E.; LEWIS, F.A. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni* **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 535-541, 2000.

LANGAND, J.; THERON, A.; POINTIER, J.P.; DELAY, B.; JOURDANE, J. Population structure of *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe Island, using RAPD markers. **Journal Mollusca Studies**, v. 65, p. 425-433, 1999.

LOUZADA, J.L.Z. Esquistossomose mansônica – Primeiro caso autóctone no Rio Grande do Sul **Revista Brasileira Medicina**, v.30, n. 8, p. 533-535, 1973.

MAGALHÃES, K.G., PASSOS, L.K.J. & CARVALHO, O.S. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.4, p.421-424, 2004.

MAVÁREZ, J.; AMARISTA, M.; POINTIER, J.P.; JARNE, P. Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1009-1011, 2000.

MICHELSON, E.H.; DUBOIS, L. Susceptibility of Bahian populations of *Biomphalaria glabrata* to an allopatric strain of *Schistosoma mansoni*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 27, p. 782-786, 1978.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – Schistosomiasis. Disponível em: <http://www.who.it/tdr/diseases/schisto> Acesso em: 20 mar 2006.

PARAENSE, W.L., A genetic approach to the systematics of planorbid molluscs. *Evolution* v. 10, p. 403–407, 1956. Apud CAMPOS, Y.R.; CARVALHO, O.S.; GOVEIA, C.O.; ROMANHA, A.J. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assessed by SSR–PCR **Acta Tropica**, v.83, p.19–27, 2002.

PARAENSE, W.L. & DESLANDES, N. The renal ridge as a reliable character for separating *Taphius glabratus* from *Taphius tenagophilus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 4, p. 456-472, 1959.

PARAENSE, W.L. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in the Neotropical Region **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, p. 269-296, 1966.

PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni* **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 13, n. 6, p. 387-390, 1971.

PARAENSE, W.L. **Fauna planorbídica do Brasil**, p. 213 – 239, 1972. Apud Lacaz, C.S. et al., Introdução à geografia médica do Brasil. Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo.

PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 15, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria oligoza* n.n. for *Tropicorbis philippianus* (Dunker) sensu Lucena **Revista Brasileira de Biologia**, v. 34, n. 3, p. 379-386, 1974.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**, v.55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* spp..n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 465-469, 1984.

PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni* **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 259-262, 1985.

PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to Southernmost Brazil, **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 577, 1987.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 1-12, 1988.

PIRES, E.R.; VIDIGAL, T.H.D.A.; TELES, H.M.S, SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Specific Identification of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria occidentalis* Populations by the Low Stringency Polymerase Chain Reaction. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.1, p.101-106, 1997.

POINTIER, J.P.; PARAENSE, W.L.; PERNOT, A.F.; DELAY, B.. *Biomphalaria straminea*: species or complex of species? p.53. Abstracts 4th International Symposium on Schistosomiasis, 1993. Apud CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular Identification of Similar Species of the Genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) Determined by a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, supl. I, p. 219-225, 1998.

RAGHAVAN, N.; MILLER, A.N.; GARDNER, M.; FITZGERALD, P.C.; KERLAVAGE, A.R.; JOHNSTON, D.A.; LEWIS, F.A.; KNIGHT, M. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni* **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 181–191, 2003

RUPP, J.C. & WOOLHOUSE, M.E.J. Impact of geographical origin on mating behaviour in two species of *Biomphalaria* (Planorbidae: Gastropoda) **Animal Behaviour**, v. 58, p. 1247–1251, 1999.

RUPPERT, E. & BARNES, D. B. 1993 **Zoologia dos invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca.

SILVEIRA, E.P.; MARÇAL JR., O.; MACHADO, M.I. Ocorrência de *Biomphalaria straminea* (Pulmonata: Planorbidae) na Estação de Aquicultura do IBAMA em Uberlândia, MG **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 401-403, 1997.

SOUZA, C.P. & LIMA, L.C. 1997 **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: FIOCRUZ/ CPqRR, 2ª ed. 79p.

SOUZA, C.P.; PASSOS, L.K.J.; CARVALHO, O.S. Resistência de *Biomphalaria peregrina* de Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, à infecção com três cepas de *Schistosoma mansoni* **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 447-450, 1988.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; NETO, E.D.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Molecular Study of Similar *Biomphalaria* Species **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n.1, p. 169-170, 1998.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; NETO, E.D.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Study of *Biomphalaria tenagophila*, *B.t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. **Journal Mollusca Studies**, v. 65, p. 143-149, 1999.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SILVA, M.C.A.; CAPPA, S.M.G.; CARVALHO, O.S. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *Biomphalaria peregrina* and *Biomphalaria oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 807-814, 2000.

STOTHARD, J.R. & KRISTENSEN, T.K. Medical and Veterinary Malacology in Africa **Parasitology Today**, v.16, n. 3, p. 85-86, 2000.

STOTHARD, J.R.; MGENI, A.F.; KHAMIS, S.; SETO, E.; RAMSAN, M.; HUBBARD, S.J.; KRISTENSEN, T.K.; ROLLINSON, D. New insights into the transmission biology of urinary schistosomiasis in Zanzibar **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 470-475, 2002.

TEIXEIRA, C.G.; ANJOS, C.B.; OLIVEIRA, V.C.; VELLOSO, C.F.P.; FONSECA, M.B.S.; VALAR, C.; MORAES, C.; GARRIDO, C.T.; AMARAL, R.S. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 9-10, 1999.

TEIXEIRA, C.G.; VALAR, C.; MORAES, C.K.; SALVANY, S.M.; BRUM, C.O.; MAURER, R.L.; BEN, R.; MARDINI, L.B.L.F.; JOBIM, M.B.; AMARAL, R.S. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000 **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 73-78, 2004.

TELES, H.M.S. & MARQUES, C.C.A. Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae) **Revista Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 76-78, 1989.

TELES, H.M.S.; PEREIRA, P.A.C.; RICHINITTI, L.M.A. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda) no Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil **Revista Saúde Pública**, V. 25, n.5, p. 350-352, 1991.

TELES, H.M.S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.30, n. 4, p. 341-349, 1996.

TELES, H.M.S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.

THERON A.; PAGES, J.R.; ROGNON, A. *Schistosoma mansoni*: distribution patters of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory process. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 1-9, 1997.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F., MAGALHÃES, M.G.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III - Baixadas Mesoregion **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.1, p. 43-46, 2002.

THIENGO, S.C.; MATTOS, A.C.; BOAVENTURA, M.F.; LOUREIRO, M.S.; SANTOS, S.B., FERNANDEZ, M.A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n. 1, p. 99-103, 2004.

TUAN, R. & BORTOLATO, P.C. Genetic markers from *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) obtained by the double stringency polymerase chain reaction technique. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, p.435-436, 2001.

VIDIGAL T.H.D.A.; NETO E.D.; CARVALHO O.D. AND SIMPSON A.J.G. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 187-194, 1994.

VIDIGAL, T.H.D.A.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p. 739-744, 1996.

VIDIGAL, T.H.D.A.; NETO, E.D.; SPATZ, L.; NUNES, D.N.; PIRES, E.R.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability and identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 103-110, 1998a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; SPATZ, L.; NUNES, D.N.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. & DIAS NETO, E. *Biomphalaria* spp.: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Experimental Parasitology** v. 89, p. 180-187, 1998b.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.G. & CARVALHO, O.S.. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**, v. 121, p. 611-620, 2000a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 57-66, 2000b.

VIDIGAL, T.H.D.A.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.5, p.661-665, 2001.

http://www.camara.gov.br/alceucollares/imagens/rs-mapa_mini.jpg

ZUIM, N.R.B.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; LINHARES, A.X. Seleção genética de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando a alteração da suscetibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni* **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 387-390, 2005.